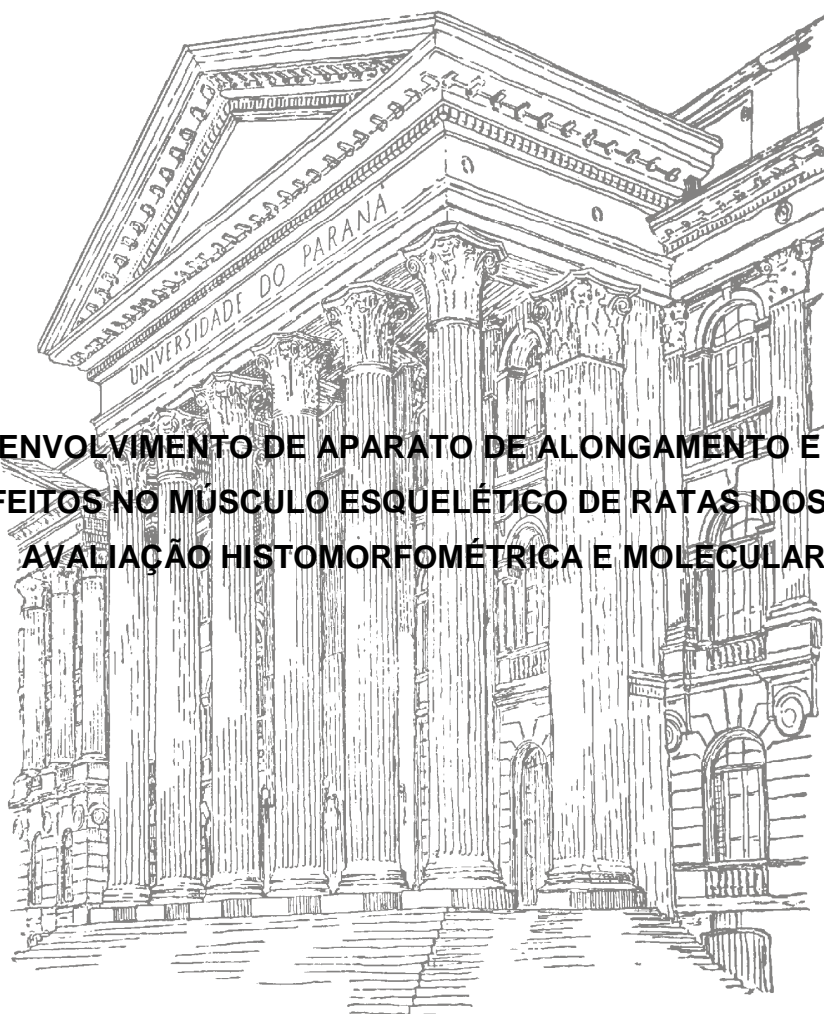


**TALITA GIANELLO GNOATO ZOTZ**

**DESENVOLVIMENTO DE APARATO DE ALONGAMENTO E SEUS  
EFEITOS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS IDOSAS:  
AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E MOLECULAR**



**CURITIBA**

**2014**

**TALITA GIANELLO GNOATO ZOTZ**

**DESENVOLVIMENTO DE APARATO DE ALONGAMENTO E SEUS EFEITOS NO  
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS IDOSAS: AVALIAÇÃO  
HISTOMORFOMÉTRICA E MOLECULAR**

**Tese de Doutorado apresentada como  
requisito parcial para a obtenção do  
Título de Doutor em Educação Física  
do Programa de Pós-Graduação em  
Educação Física, do Setor de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná.**

**Orientadora: Profa Dra Anna Raquel S. Gomes (UFPR)**

**Co-orientação: Profa Dra Sabrina Peviani Messa (UFSCar)**



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Educação Física




## TERMO DE APROVAÇÃO


**TALITA GIANELLO GNOATO ZOTZ**

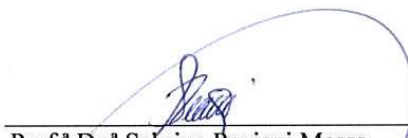
**“Desenvolvimento de aparato de alongamento e seus efeitos no músculo esquelético de ratas idosas: avaliação histomorfométrica e molecular”**

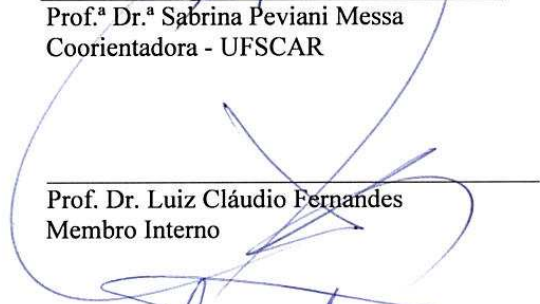
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Educação Física – Área de Concentração: Exercício e Esporte; Linha de Pesquisa: Atividade Física e Saúde; do Programa de Pós-Graduação em Educação Física do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:


  
Prof.ª Dr.ª Anna Raquel Silveira Gomes  
Presidente / Orientadora - UFPR

  
Prof. Dr. Paulo Cesar Barauce Bento  
Membro Interno

  
Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti  
Membro Externo

  
Prof.ª Dr.ª Sabrina Peviani Messa  
Coorientadora - UFSCAR

  
Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes  
Membro Interno

  
Prof.ª Dr.ª Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro  
Membro Externo

Curitiba, 12 de Setembro de 2014.

## *Agradecimentos*

*A Deus.*

*A minha família: meus pais, Zé e Thais que sempre me apoiaram, incentivaram e entenderam as ocasiões que precisei abdicar de momentos em família para cumprir meu objetivo. Muitíssimo obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim, amo vocês!*

*Ao Rafael (meu príncipe) que esteve junto comigo em todos os momentos, auxiliando em todas as etapas da pesquisa e vibrando junto comigo a cada conquista. Obrigada pelo carinho, compreensão e amor que você tem comigo!*

*A todos os membros da banca, que aceitaram esse convite, para contribuir com esta pesquisa.*

*As minhas amigas: Viviane, Janaína e Eliza, que torceram por mim e me apoiaram em cada passo desta caminhada.*

*A Elis, Lili e Hilana, minhas queridas, pela troca de experiências, período de convivência, torcendo uma pela outra, viagem, congressos, vocês conquistaram um lugar especial em meu coração.*

*Ao Marcos, por ter me acompanhado e auxiliado em grande parte dos experimentos, jamais esquecerei seu apoio.*

*A professora Tânia Salvini, que abriu as portas do laboratório para que eu pudesse aprender a Biologia Molecular e que nos deu apoio financeiro para que realizássemos a Biologia Molecular na UFPR, graças a você, conseguimos implementar a técnica no laboratório e realizar a tão sonhada análise de expressão gênica.*

*A professora Sabrina Messa Peviani, que foi extremamente paciente para me ensinar todas as técnicas de Biologia Molecular, desde pipetar até fazer um cDNA e PCR. Todas as vezes que enviei e-mails contando que as técnicas não estavam dando certo, você sempre me incentivou a continuar, nunca me esquecerei de sua generosidade comigo. Aprendi muito contigo!*

*Ao professor Mário Navarro, que abriu as portas do laboratório para mim e deu todo o apoio para desenvolver a Biologia Molecular, sempre preocupado com o andamento dos meus experimentos. Admirável pesquisador.*

*Ao Luiz Guilherme, que auxiliou no protocolo de alongamento, dando o suporte técnico e científico na anestesia das ratas. Mesmo com todas as demandas do seu doutorado, foi muito prestativo e solícito, o seu suporte foi essencial para o desenvolvimento do meu projeto.*

*Ao professor Paulo Broffman, que autorizou a utilização do laboratório para realização do protocolo de alongamento.*

*Ao Eduard Goossen, que quebrou a cabeça junto com a Anna Raquel e eu, para o desenvolvimento do aparato, a sua contribuição foi excepcional e de suma importância para que esta tese fosse desenvolvida.*

*Ao professor Iriossan Antônio Bassania, por ter dado o suporte técnico e científico para realizar a calibração da célula de carga.*

*A professora Ana Tereza Bittencout Guimarães, por ter auxiliado na estatística da linearidade da leitura da célula de carga.*

*A professora Lúcia Noronha e toda sua equipe do laboratório (Ana Paula, Marina e Seigo), pelo suporte técnico e científico para confecção das lâminas de HE e imunohistoquímica, sempre solícitos e pacientes comigo.*

*A professora Thelma, por ter permitido a utilização do microscópio para fotografia dos sarcômeros.*

*Ao professor Iriossan Bassani, por ter me ensinado a calibrar uma célula de carga e direcionado a como realizar a calibração do aparato de alongamento.*

*Ao professor Emmanuel, por ter permitido que a análise de PCR Real Time fosse realizada em seu laboratório.*

*A professora Silvia Valderramas por ter ensinado a fazer revisão sistemática e interpretar gráficos de metá-análise.*

*A minha amiga, Ana Paula Cunha Loureiro, sempre presente e me dando suporte mesmo morando um período na Noruega.*

*As professoras Sibeles e Arlete, que auxiliaram na supervisão do meu Estágio Docência, e me ensinaram o que é ser docente, aprendi muito com vocês.*

*A professora Helena, por ter emprestado o homogeneizador para realizar a extração de RNA.*

*Ao pessoal do laboratório de Entomologia: Anna Mazza, Thalita, Débora, Mayara, Betina, Vinícius e Oscar, por terem me ensinado a rotina do laboratório e me auxiliado nos momentos de dúvidas.*

*Ao André César Lopes, por ter feito as imagens do aparato de alongamento.*

*A Lye Miague, por ter auxiliado nas tentativas de análise da arquitetura muscular com o ultrassom diagnóstico.*

*A CAPES, pela bolsa REUNI, que possibilitou minha dedicação exclusiva ao doutorado.*

*Ao programa de pós-graduação em Educação Física, especialmente a coordenadora do curso Profa. Joice e ao secretário Rodrigo, pela cordialidade que sempre me atenderam e pela disponibilidade em me auxiliar.*

## ***Agradecimento Especial***

*A Anna Raquel,*

*Por ter me aceitado como sua aluna, permitindo que meu sonho de ser pesquisadora chegasse mais perto. Você me ensinou tanto: o que é ser docente; a montar uma boa aula; a fazer prestação de contas; a escrever um artigo científico; a não ter vergonha de pedir ajuda; a ser política; a fazer pesquisa de qualidade; a ser generosa com os demais pesquisadores; a ser paciente.*

*Por ter sido paciente comigo, por ter acreditado e investido em mim; por ter me estimulado a participar do teste seletivo para professora substituta na Universidade Federal do Paraná; por ser minha amiga; pelas reuniões regadas a cafés diferentes. Você é admirável como pessoa e pesquisadora, adoro você!*

*Dedicatória*

***À meus pais e Rafael***



“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!”

Chico Xavier

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	13
LISTA DE TABELAS .....	15
LISTA DE ABREVIACÕES.....	16
RESUMO.....	19
ABSTRACT .....	20
INTRODUÇÃO .....	21
REVISÃO DE LITERATURA .....	25
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	26
2.1. ENVELHECIMENTO DO MÚSCULO-ESQUELÉTICO .....	26
2.1.2 Matriz extracelular (MEC) e a regulação do colágeno.....	30
2.1.2.1 Vias de Sinalização do TGFβ-1.....	35
2.1.3 Envelhecimento da MEC.....	37
2.2 Mecanismo de Mecanotransdução.....	40
2.3.1 Efeitos do Envelhecimento no Mecanismo de Mecanotransdução .....	44
2.4 Prescrição de Exercícios de Alongamento para Idosos .....	47
2.4.1 Estudos Experimentais sobre o Exercício de Alongamento .....	52
2.4.2 Modelos Animais de Envelhecimento para estudo dos efeitos do exercício ..	58
2.5 OBJETIVOS .....	62
2.5.1 Objetivo Geral .....	62
2.5.2 Objetivos Específicos .....	62
2.6 HIPÓTESES.....	62
3. MATERIAIS E MÉTODO .....	64
MATERIAIS E MÉTODO.....	65
3.1 MATERIAIS E MÉTODO- ETAPA 1 .....	67
3.1.1 Anestesia .....	68
3.1.2 Aparato de Alongamento.....	68
3.1.2.1 Calibração da Célula de Carga .....	71
3.1.3 Protocolo de Alongamento Piloto e Leitura da Célula de Carga .....	72
3.1.3.2 Fotometria .....	73
3.1.4 Análise Estatística .....	74
3.2 MATERIAIS E MÉTODO- ETAPA 2 .....	86
3.2.1 Protocolo de Alongamento Experimento .....	87

3.2.2 Métodos De Avaliação .....	89
3.2.3 <i>Análise da área de Secção Transversa das Fibras Musculares-ASTFM (Morfometria)</i> .....	90
3.2.4 <i>Procedimento para a contagem do número de sarcômeros em série</i> .....	92
3.2.5 <i>Análise Estatística</i> .....	92
3.3 MATERIAIS E MÉTODO- ETAPA 3 .....	107
3.3.1 <i>Análise Imunohistoquímica</i> .....	110
3.3.2 <i>Análise Estatística</i> .....	112
3.4 MATERIAIS E MÉTODO- ETAPA 4 .....	125
3.4.1 Isolamento de RNA total .....	126
3.4.2 Transcrição Reversa (RT): .....	128
3.4.3 Primers .....	129
3.4.4 PCR em Tempo Real .....	129
3.4.5 <i>Análise Estatística</i> .....	131
4. RESULTADOS- ETAPA 1 .....	76
4.1 APARATO DE ALONGAMENTO .....	77
4.1.1 Massa Corporal.....	77
4.1.2 Calibração da Célula de Carga .....	77
4.1.3 Força (N) para promover o alongamento do músculo sóleo .....	78
4.1.4 Ângulo da articulação Talo-Crural (fotometria).....	80
4.2 RESULTADOS- ETAPA 2 .....	94
4.2.1 Força (N) aplicada para promover o alongamento do músculo sóleo .....	95
4.2.2 Massa Corporal .....	95
4.2.3 Massa Muscular .....	96
4.2.4 Comprimento Muscular do Sóleo .....	97
4.2.5 Área De Secção Transversa Das Fibras Musculares (ASTFM) .....	98
4.2.6 Estimativa de Sarcômeros em Série .....	99
4.2.7 Comprimento do Sarcômero .....	99
4.3 RESULTADOS- ETAPA 3 .....	113
4.3.1 Porcentagem de Colágeno I por área total de fibra muscular .....	114
4.3.2 Porcentagem de Colágeno III por área total de fibra muscular .....	115
4.4 RESULTADOS- ETAPA 4 .....	132
4.4.1 Expressão Gênica de TGFβ-1 .....	133
5 DISCUSSÃO- ETAPA 1 .....	81

5.1 Aparato de Alongamento.....	82
5.2 DISCUSSÃO- ETAPA 2 .....	101
5.3 DISCUSSÃO- ETAPA 3 .....	119
5.4 DISCUSSÃO- ETAPA 4 .....	134
6. CONCLUSÕES .....	139
7. APOIO FINANCEIRO .....	140
8. APOIO TÉCNICO .....	140
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	142
ANEXOS .....	167
ANEXO I – Parecer do Cômite de Ética em Uso Animal.....	168
Anexo II - PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO.....	169

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diferença entre Sarcopenia e Caquexia.....	29
Figura 2: Regulação e Desregulação da Regeneração Muscular.....	34
Figura 3– Via de sinalização do TGF $\beta$ -1.....	36
Figura 4: Mudanças da MEC com o processo de envelhecimento.....	38
Figura 5: Mecanismo de mecanotransdução celular.....	41
Figura 6: Mecanotransdução desregulada devido a processo de envelhecimento. ...	46
Figura 7 – Representação da fibra muscular mostrando a estrutura do sarcomero com os filamentos de actina e miosina.....	52
Figura 8: Representação da disposição dos sarcômeros no tecido muscular. Alterações na massa muscular, atribuídas a adição de sarcômeros.....	54
Figura 9. Etapas do Estudo. AST.....	66
Figura 10. Descritivo do Aparato de Alongamento.....	69
Figura 11. Animal em decúbito dorsal, com o membro posterior esquerdo posicionado para o alongamento muscular.....	70
Figura 12. Desenho esquemático apresentando detalhes da posição do joelho e músculo sóleo durante o alongamento.....	70
Figura 13. Protocolo de calibração do aparato de alongamento.....	72
Figura 14. Fotometria.....	74
Figura 15: Etapas de indução anestésica.....	88
Figura 16. Coleta do músculo sóleo esquerdo.....	90
Figura 17. Etapas da secção do músculo sóleo esquerdo.....	90
Figura 18. Corte transversal do músculo sóleo corado com HE para mensuração da ASTFM por meio do programa <i>IMAGE J</i> .....	91
Figura 19: Fotomicrografia (100x em imersão) de fibra isolada de músculo sóleo de rata, preparada para contagem do número de sarcômeros em série.....	92
Figura 20. Confecção das lâminas de imunohistoquímica.....	109
Figura 21. Corte transversal do músculo sóleo, técnica de imunohistoquímica.....	111
Figura 22 – Etapas de extração do RNA.....	127
Figura 23 – Gel de agarose (1%) corado com Safer indicando a integridade do RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 28s e 18s.....	127
Figura 24 – Gel de agarose (1%) não denaturante, corado com Safer, no qual pode ser visualizada a integridade do cDNA, obtido através de reação de transcrição reversa (RT).....	128
Figura 25- Representação gráfica da amplificação do produto do PCR para determinar a amplificação exponencial (Ct, <i>cycle threshold</i> ) do TGF $\beta$ -1, que foi utilizado como dado para a análise da sua expressão gênica.....	131
Figura 26- Curva de dissociação demonstrando a especificidade do primer do TGF $\beta$ -1.....	131
Figura 27. Linearidade das medidas da célula de carga.....	78
Figura 28. Diferença entre força (N) inicial e final, aplicada para promover o alongamento do músculo sóleo.....	95

Figura 29. Efeitos agudos do exercício de alongamento na massa corporal (g) (p<0,05).....	96
Figura 30. Efeitos agudos do exercício de alongamento na massa muscular (mg). .	97
Figura 31. Efeitos agudos do exercício de alongamento no comprimento muscular (mm).....	98
Figura 32. Efeitos agudos do exercício de alongamento na ASTFM ( $\mu\text{m}^2$ ). .....	98
Figura 33. Efeitos agudos do exercício de alongamento no número de sarcômeros em série.....	99
Figura 34. Efeitos agudos do exercício de alongamento no número de sarcômeros em série.....	100
Figura 35 – Corte transversal do músculo sóleo, técnica de imunohistoquímica. Comparação de imunopositividade intergrupos para colágeno.....	115
Figura 36 - Corte transversal do músculo sóleo, técnica de imunohistoquímica. Comparação de imunopositividade intergrupos para colágeno III.....	116
Figura 37 Corte transversal do músculo sóleo, técnica de imunohistoquímica. Comparação de imunopositividade intergrupos para TGF $\beta$ -1.....	117
Figura 38 - Efeitos agudos do exercício de alongamento na expressão gênica do TGF $\beta$ -1 do músculo sóleo. ....	133

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos com protocolos de alongamento em ratos e seus desfechos.....	57
Tabela 2: Idade de ratos em meses relacionada com a idade de humanos em anos . .....	60
Tabela 3. Seqüência nucleotídica dos primers para medir a expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.....	129
Tabela 4. Massa Corporal e Idade dos Grupos.....	77
Tabela 5. Dados referentes a Leitura da Célula de Carga e Força registrada (N) ....	78
Tabela 6. Força (N) aplicada para promover o alongamento do músculo sóleo. ....	79
Tabela 7. Ângulo da articulação talo-crural em ratas jovens e ratas idosas.....	80
Tabela 8. Diferença relativa entre Massa Corporal Inicial e Final intergrupos. ....	96
Tabela 9. Diferença relativa entre o massa corporal final e massa muscular intergrupos. ....	97
Tabela 10. Comparação da porcentagem de Colágeno I entre grupo controle e alongamento.....	114
Tabela 11. Comparação da porcentagem de Colágeno III entre grupo controle e alongamento.....	116
Tabela 12. Comparação da porcentagem de TGF $\beta$ -1 entre grupo controle e alongamento.....	117
Tabela 13. Relação entre Colágeno I e Colágeno III por área de fibra muscular intragrupo. ....	118

## LISTA DE ABREVIACÕES

<b>ACSM</b>	Colegio Americano de Medicina Esportiva
<b>ActRIIb</b>	receptor de activina tipo IIb
<b>ADM</b>	amplitude de movimento
<b>ALK</b>	Linfoma anaplásico receptor de tirosina quinase
<b>AGE</b>	Produtos finais de glicação avançada
<b>Ankrd2</b>	Ankyrin repetição de domínio - contendo proteína 2
<b>AKT</b>	proteína kinase B
<b>AST</b>	área de secção transversa
<b>ASTFM</b>	<i>área de Secção Transversa das Fibras Musculares</i>
<b>CARP</b>	Proteína
<b>cDNAs</b>	<i>Acido desoxirribonucleico complementar</i>
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética em Utilização Animal
<b>cm</b>	Centímetros
<b>co-Smad</b>	Mediador comum Smad
<b>Ct</b>	Ciclo limite
<b>CTGF</b>	Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo
<b>DEPC</b>	<i>diethyl pytocarbonate 97%</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO</b>	densidade óptica
<b>FAK</b>	Quinase de adesão focal
<b>FOXO</b>	<i>forhead box O</i>
<b>GA</b>	grupo alongamento
<b>GC</b>	grupo controle
<b>GDFs</b>	fatores de crescimento e diferenciação
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>ICC</b>	Coeficiente de correlação intra-classe
<b>IGF</b>	fator de crescimento insulínico



<b>IL</b>	Interleucinas
<b>JNK – c-Jun N</b>	quinase terminal
<b>kgf</b>	kilograma-força
<b>LACEN</b>	Laboratório Central do Estado do Paraná
<b>LOX</b>	lisina oxidase
<b>MAPK</b>	proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MEC</b>	matriz extracelular
<b>MyoD</b>	fator regulatório miogênico
<b>MGF</b>	fator de crescimento mecânico
<b>mm</b>	Milímetros
<b>M-MLV RT</b>	vírus da leucemia murina <i>de transcrição reversa de Moloney</i>
<b>MMPs</b>	metaloproteinases
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MSTN</b>	Miostatina
<b>MURF-1</b>	<i>Muscle ring finger 1</i>
<b>mV</b>	Milivolts
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>N</b>	Newton
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAL</b>	peptídeo associado a latência
<b>p-AKT</b>	proteína quinase B fosforilada
<b>PCR</b>	Reações em cadeia polimerase
<b>PI-3 Kinase</b>	fosfatidilinositol-3 quinase
<b>p-p70S6k</b>	fosfo –p70 quinase S6
<b>PUCPR</b>	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
<b>Ras</b>	Proteína <i>Rat Sarcoma Vírus</i> – vírus sarcoma do rato
<b>RNA</b>	<i>Acido Ribonucleico</i>
<b>RNAm</b>	<i>Ácido ribonucleico mensageiro</i>
<b>R-Smad</b>	Receptores Smad

<b>RT</b>	Transcrição Reversa
<b>s</b>	Segundos
<b>SEM</b>	<i>Erro padrão da medida</i>
<b>SRF</b>	fator soro de resposta
<b>TE</b>	TRIS HCL/EDTA
<b>TβR-II</b>	Receptor tecidual β II
<b>TGFβ</b>	Fator beta de Crescimento Tecidual
<b>TIMP</b>	Inibidor tissular de metaloproteinase
<b>TNFα</b>	<i>Fator alfa de necrose tumoral</i>
<b>UFPR</b>	Universidade Federal do Paraná
<b>UFSCar</b>	Universidade Federal de São Carlos
<b>μm<sup>2</sup></b>	Micrometro ao quadrado

## RESUMO

Tem sido demonstrado que exercícios de alongamento podem melhorar a flexibilidade, equilíbrio, bem-estar e independência em idosos. No entanto, apesar destes exercícios comumente constituírem programas de treinamento, ainda não estão esclarecidas quais são as adaptações morfológicas e moleculares induzidas pelos exercícios de alongamento no músculo esquelético de idosos. **Objetivo:** desenvolver aparato de alongamento e avaliar os efeitos agudos do alongamento mecânico passivo estático na morfologia, sarcomerogênese e na modulação de importantes componentes da matriz extracelular do músculo sóleo de ratas idosas. **Métodos:** O estudo foi dividido em 4 etapas: **Etapa 1** (estudo piloto); **Etapa 2** (experimento) e **Etapa 3** (imunohistoquímica), **Etapa 4** :análise da expressão gênica por reação em cadeia polimerase em tempo real (RT- PCR). **Etapa 1:** realizado com 6 ratas jovens (3 meses) e 6 ratas idosas (15 meses), para padronizar a utilização do aparato de alongamento e comparar a força necessária para promover o exercício entre ratas jovens e idosas; **Etapa 2:** foram utilizadas 15 ratas idosas, com 26 meses, divididas em dois grupos: alongamento (n=8,GA) e controle (n=7,GC). O protocolo de alongamento consistiu em uma série de 4 repetições de 1 minuto com intervalo de 30 segundos entre cada repetição. O alongamento foi realizado no músculo sóleo esquerdo, 3 vezes por semana, durante 1 semana, sempre no mesmo horário do dia, totalizando 3 sessões de alongamento,. Para tanto, as ratas foram anestesiadas por via inalatória com isoflurano (5% para 2,5 l O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>). Após as três sessões, as ratas foram anestesiadas para retirada do músculo sóleo esquerdo, e então ortotanasiadas e as seguintes análises foram realizadas: área de secção transversa das fibras musculares e número de sarcômeros em série; **Etapa 3:** imunohistoquímica para quantificação de colágeno I, III e TGFβ-1. **Etapa 4:** análise da expressão do gene TGFβ-1. **Resultados:** **Etapa1:** Foi verificado decréscimo na força necessária para promover o alongamento em ratas idosas quando comparada as jovens (0,48±0,04 N vs 0,65±0,04 N, p<0,05, Kruskal-Wallis); **Etapa 2:** foi verificada redução na área de secção transversa das fibras musculares do GA quando comparadas ao GC (p=0,0001, Kruskal-Wallis); não houve diferença no número de sarcômeros em série intergrupos (p=0,94, ANOVA); **Etapa 3:** a porcentagem de colágeno I foi significativamente menor no GA quando comparado ao GC (p=0,01, Kruskal-Wallis), assim como a porcentagem de TGFβ-1 (p=0,04, Kruskal-Wallis); já o colágeno III foi significativamente maior no GA do que no GC (7,06±6.88% vs 4,92± 5,30%, p=0,01, Kruskal-Wallis). **Etapa 4:** a expressão gênica de TGFβ-1 foi significativamente menor no GA quando comparado ao GC (p=0,005, ANOVA). **Conclusão:** O aparato desenvolvido foi eficiente para promover o alongamento muscular mecanicamente e, foi necessário menor aplicação de força para induzir o alongamento em ratas idosas, o que pode ser atribuído a redução de torque passivo característico do processo de envelhecimento. Além disso, o alongamento agudo induziu atrofia muscular, apesar de favorecer a mecanotransdução e ter ação antifibrótica.

**Palavras-chave:** exercício de alongamento muscular, sarcopenia, ratas, envelhecimento, colágeno, inovação.

## ABSTRACT

It has been shown that stretching exercises can improve flexibility, balance, wellbeing and independence in the elderly. However, despite these exercises commonly constitute training programs, it is still unclear the morphological and molecular adaptations induced by stretching exercises in aged skeletal muscle. **Objective:** To develop an apparatus to stretch and assess the acute effects of passive mechanical static stretching on morphology, sarcomerogenesis and modulation of important components of the extracellular matrix of the aged female rats soleus muscle. **Methods:** The study was divided into 4 steps: **Step 1** (pilot study); **Step 2** (experiment); **Step 3** (immunohistochemistry) and **Step 4** (Real-Time Polymerase Chains Reactions-RT-PCR). **Step 1:** it was performed with 6 female young rats (3 months) and 6 female aged rats (15 months), to standardize the use of the apparatus for stretching and compare the force necessary to promote exercise among young and old rats; **Step 2:** Stretching (n = 8, SG) and control (n = 7, CG): 15 old rats with 26 months divided into two groups were used. The stretching protocol consisted by 4 repetitions of 1 minute each with 30 seconds interval between each repetition. Stretching was performed on the left soleus muscle, 3 times a week for 1 week, at the same time of the day, ending 3 sessions of stretching,. For this, the rats were anesthetized with isoflurane inhalation (5% para 2,5 l O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>).. After three sessions, the rats were anesthetized for removing the left soleus muscle, and then euthanized and the following analyzes were performed: muscle fibers cross-sectional area and serial sarcomere number; **Step 3:** immunohistochemistry for quantification of collagen I, III and TGFb-1. **Step 4:** gene expression of TGFb-1. **Results:** **Step1-** it was required less force to promote the stretching in aged rats compared to young ( $0.48 \pm 0.65$  N vs  $0.04 \pm 0.04$  N,  $P < 0.05$ , Kruskal-Wallis); **Step 2:** it was observed a decrease in muscle fiber cross-sectional area of SG compared to the control group ( $p = 0.0001$ , Kruskal-Wallis); there was no difference in the serial sarcomere number ( $p = 0.94$ , ANOVA); **Step 3:** The percentage of type I collagen was significantly lower in the GA when compared to CG ( $p = 0.01$ , Kruskal-Wallis), as well as percentage of TGFb-1 ( $p = 0.04$ , Kruskal-Wallis); collagen III was significantly higher in GA than in the CG ( $7.06 \pm 6.88\%$  vs  $4.92 \pm 5.30\%$ ,  $p = 0.01$ , Kruskal-Wallis). **Step 4:** gene expression of TGFb-1 was significantly lower in the GA compared to the CG ( $p = 0.005$ , ANOVA). **Conclusion:** The apparatus was efficient to promote muscle stretching and old soleus muscle required less force to perform it, which can be attributed to the reduction in passive torque related to the aging process. Moreover, the acute stretching induced muscle atrophy, nevertheless affecting mechanotransduction and with antifibrotic action.

**Key-words:** Muscle stretching exercise, sarcopenia, rats, aging, collagen, innovation.

## INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a faixa etária de 60 anos ou mais é a que mais cresce mundialmente em termos proporcionais (WHO, 2011). Além disso, observa-se aumento da expectativa de vida, que no Brasil atualmente é de 73,5 anos em média (IBGE, 2010). Aliado ao declínio das taxas de natalidade da população, a partir da década de 70, observa-se modificações na pirâmide etária brasileira, com aumento do número de idosos (CARVALHO e RODRÍGUEZ-WONG, 2008).

No Brasil, existem atualmente 21,7 milhões de idosos, o que representa mais de 10% da população (IBGE, 2010). Segundo as projeções, estima-se que no ano de 2040, o Brasil terá 55 milhões de idosos, o que representará 27% da população, sendo que 13 milhões terão mais de 80 anos. No estado do Paraná existe atualmente 1,2 milhão de idosos, em Curitiba são 133.619 idosos, representando 8% da população, sendo que a maioria, 56%, se encontra na faixa dos 60 a 69 anos; 59% são mulheres (IBGE 2010). De acordo com Martins *et al.*, (2013), as limitações funcionais relacionadas ao envelhecimento são mais frequentes no sexo feminino.

As alterações dos sistemas orgânicos fisiológicos do corpo humano, relacionadas ao envelhecimento, são problemas importantes de saúde pública em rápida expansão (PEIXOTO *et al.*, 2004). A senescência é responsável por uma série de alterações estruturais e funcionais do organismo, com declínio de todas as variáveis fisiológicas, as quais contribuem para prejuízos no desenvolvimento das habilidades motoras, incapacidade de realizar tarefas da vida diária como caminhar, subir escadas, carregar sacola de compras, entre outras, e deterioração da saúde (SANTOS *et al.*, 2008; CASEROTTI, 2010). A diminuição da massa muscular, denominada sarcopenia, e da flexibilidade, contribuem para o declínio na funcionalidade, relacionado ao processo de envelhecimento (VISSER e SCHAAP, 2011; HOLLAND *et al.*, 2002).

A diminuição da flexibilidade é decorrente de adaptações musculares que levam ao encurtamento adaptativo musculotendíneo, que pode afetar a mobilidade

e o equilíbrio de maneira a modificar os padrões funcionais dos idosos (NONAKA *et al.*, 2002; KLEIN *et al.*, 2002; HOLLAND *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2013).

Um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento e progressão da sarcopenia é o declínio de estrogênio em mulheres, associado à menopausa, possivelmente, os esteróides sexuais femininos exercem efeitos anabólicos sobre o músculo pela conversão tissular em testosterona (MACALUSO e De VITO, 2004; MALTAIS *et al.*, 2009).

A sarcopenia independe da localização e da função do músculo, parece ser causada pela redução da área de secção transversa das fibras musculares, do número de fibras musculares e quantidade e qualidade de proteínas das unidades contráteis (actina e miosina) (ZHONG *et al.*, 2007), além de estar associada ao aumento da fibrose intramuscular (BIRBRAIR *et al.*, 2013). Ocorre em todos os indivíduos em algum grau como consequência da idade, mas pode ser acelerada por uma variedade de fatores incluindo inatividade, nutrição pobre e doenças crônicas (THOMAS, 2007).

Muitas das alterações fisiológicas atribuídas ao envelhecimento são semelhantes àsquelas induzidas pela inatividade imposta e que provavelmente podem ser atenuadas ou até mesmo revertidas pelo exercício (LEITE *et al.*, 2010). Ainda em relação a essas alterações fisiológicas, cabe ressaltar, as mudanças sofridas pela matriz extracelular (MEC) no músculo envelhecido (KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011). Considerando que esta é responsável pela transmissão de força e pela resposta passiva elástica do tecido muscular, tais modificações contribuem para a deterioração da função muscular (KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011).

A MEC do músculo esquelético é constituída principalmente por colágenos fibrilares do tipo I e III, localizados especialmente no epimísio e endomísio, respectivamente (KOSKINEN *et al.*, 2002, CALVI *et al.*, 2012, KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011). Entretanto, com o envelhecimento ocorre alteração na síntese dos colágenos, na qual o colágeno I aumenta consideravelmente a deposição no tecido muscular em relação ao colágeno III, conferindo a rigidez muscular característica do idoso (CALVI *et al.*, 2012, KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011). Tal alteração pode ser atribuída à redução de fatores mecânicos de crescimento

muscular, enquanto que, o fator TGF $\beta$  (fator  $\beta$  de crescimento tecidual) está aumentado, fato que, potencializa a deposição de colágeno e tecido fibrótico no músculo (LI *et al.*, 2013).

Neste sentido, é importante investigar a modulação da deposição de colágeno no tecido muscular idoso com o objetivo de prevenir a deterioração da função musculoesquelética. Foi mostrado em artigo recente de revisão que, técnicas de exercício que envolve contração muscular apresentam efeito positivo na modulação da síntese de colágeno no músculo idoso (KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011).

Além dos exercícios que envolvem contração muscular apresentarem benefícios para o músculo idoso, tem sido demonstrado que exercícios de alongamento podem melhorar a flexibilidade, torque, equilíbrio, bem-estar e independência em idosos (FELAND *et al.*, 2001; GAJDOSIK *et al.*, 2005; CRISTOPOLISKI *et al.*, 2008; BIRD *et al.*, 2009; BATISTA *et al.*, 2009; GALLON *et al.*, 2011). Em ratos jovens tem sido observado que exercícios de alongamento podem prevenir a proliferação de tecido conjuntivo e aumentar o número de sarcômeros em série e a área de secção transversa das fibras musculares (COUTINHO *et al.* 2004; COUTINHO *et al.*, 2006; CAÇÃO-BENEDINI *et al.*, 2013). No entanto, apesar dos exercícios de alongamento comumente constituírem programas de treinamento, ainda não estão esclarecidas quais são as adaptações histomorfológicas e moleculares, induzidas pelos exercícios de alongamento, na MEC e no músculo esquelético de idosos.

As recomendações do Colegio Americano de Medicina Esportiva (ACSM, 2011), propõem que o exercício físico é necessário para melhorar e manter a saúde da população idosa, com atividades que incluam exercícios aeróbicos, treinamento de força, flexibilidade e equilíbrio. As evidências para prescrição de exercícios de alongamento têm preconizado duração entre 30-60 segundos, para grandes grupos musculares, sendo que para ganhos de flexibilidade recomenda-se tempo total de 60s para cada grupamento alongado, 3-4 repetições. Quanto a frequencia semanal, incrementos na flexibilidade têm sido obtidos entre 2 a 3 vezes por semana, no entanto, para ganhos mais expressivos recomenda-se 5 vezes por semana, e para manutenção 1 vez por semana.

Em relação aos efeitos promovidos pelo exercício de alongamento muscular, estes podem ser divididos em agudos e crônicos. Considera-se efeito agudo do alongamento muscular resultados imediatos e em curto prazo (KOKKONEN *et al.*, 1998, NELSON *et al.*, 2005; KOKKONEN *et al.*, 2007, BARANDA e AYALA, 2010; KAMIKAWA *et al.*, 2013). Já os efeitos crônicos representam os resultados tardios do alongamento que podem durar dias, semanas e meses (KOKKONEN *et al.*, 2007, BARANDA e AYALA, 2010) (COUTINHO *et al.*, 2004; GAJDOSIK *et al.*, 2005; SECCHI *et al.*, 2008; WEPPLER e MAGNUSSON, 2010).

Estudos experimentais a respeito dos efeitos do exercício de alongamento no músculo esquelético apresentam resultados importantes para direcionamento da prescrição deste exercício na prática clínica (COUTINHO *et al.*, 2004; COUTINHO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2004; PEVIANI *et al.*, 2007; PEVIANI *et al.*, 2009). Entretanto, todos estes estudos realizaram o alongamento de forma manual, ou seja, sem monitoramento da força aplicada para promover tal estímulo, assim, para replicabilidade dos estudos e extrapolação dos resultados para humanos, julga-se importante o monitoramento da força aplicada para induzir o alongamento muscular em animais experimentais.

Considerando que a síntese de colágeno no músculo esquelético foi observada em humanos, como resposta aguda ao exercício (LANGBERG *et al.*, 1999; MOORE *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2005), e que em ratos jovens verificou-se que o alongamento pós-imobilização induziu a reorganização molecular do colágeno e hipertrofia muscular (COUTINHO *et al.*, 2006), dessa forma, justifica-se a análise dos efeitos agudos do exercício de alongamento mecanicamente induzido, na histomorfometria e modulação do colágeno, no músculo de ratas idosas. Portanto, os principais objetivos da presente tese foram: 1- desenvolver e validar aparato para alongar mecanicamente o músculo esquelético de ratos; 2- avaliar os efeitos agudos do alongamento mecânico passivo estático na morfologia, sarcomerogênese e modulação de componentes da matriz extracelular do músculo sóleo de ratas idosas.





## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O processo de envelhecimento é dinâmico e irreversível e caracteriza-se por vulnerabilidade às agressões dos meios interno e externo. É dito senescência, quando o envelhecimento biológico ocorre de forma fisiológica e senilidade quando é patológico (ROCHA, REIS e TEIXEIRA, 2010).

De acordo com Rocha, Reis e Teixeira (2010), o envelhecimento é um processo altamente complexo associado à deterioração e à reestruturação de funções em todo o sistema do corpo humano. Dentre os sistemas do organismo, os que mais sofrem efeitos desse processo são o nervoso, o endócrino, o imunológico e músculo-esquelético. O envelhecimento músculo-esquelético afeta diretamente a massa e a força musculares, o equilíbrio e várias habilidades funcionais (BALLAK *et al.*, 2014). Dessa forma, análises aprofundadas desse sistema tornam-se fundamentais para a investigação dos efeitos de exercícios físicos no idoso.

### 2.1. ENVELHECIMENTO DO MÚSCULO-ESQUELÉTICO

O envelhecimento é acompanhado do declínio progressivo da massa muscular e da capacidade de gerar força, processo conhecido como sarcopenia (BALLAK *et al.*, 2014; FIELDING *et al.*, 2011) que se inicia entre 40 e 60 anos de idade (FAULKNER *et al.*, 2007). Presume-se que esses declínios na função e massa muscular, tenham relação direta com o aumento dos índices de quedas, transição para um estilo de vida dependente e redução na qualidade de vida dos idosos (BALLAK *et al.*, 2014). Sendo assim, a sarcopenia, devido as suas consequências, é considerada um dos principais problemas clínicos e fisiológicos na geriatria e gerontologia (FRONTERA *et al.*, 2008), e a redução da força muscular, característica do processo de envelhecimento é denominada, dinapenia (CLARK e MANINI, 2008).

De acordo com Clark e Manini (2008), o conceito de dinapenia foi criado para diferenciar a perda de massa muscular da perda de força muscular, pois, a perda de massa muscular (sarcopenia) não explica por si só a perda de força muscular (dinapenia). A perda da força e potência muscular que ocorre com o avançar da idade está relacionada a fatores miogênicos e neurais, e estão fortemente

correlacionadas com o risco de quedas (LORD *et al.*, 2002; PIJNAPPELS *et al.*, 2008). A preferencial atrofia de fibras musculares do tipo II, denervação dos motoneurônios, maior coativação da musculatura antagonista e diminuição dos níveis de atividade física em idosos são algumas das causas da dinapenia (MISZKO *et al.*, 2003).

O mecanismo de envelhecimento do músculo-esquelético não é totalmente elucidado, entretanto, Mann e colaboradores (2011) sugerem, em revisão sistemática, que este mecanismo pode estar relacionado a alterações hormonais, fatores inflamatórios e modificações na ingestão calórica e de proteínas, e também possa ocorrer por modificações ou declínio dos sistemas nervoso central e periférico. Além disso, o envelhecimento músculo-esquelético está associado à presença intramuscular de tecido adiposo e outros tecidos não contráteis, os quais causam redução da qualidade muscular (RYALL, SCHERTZER e LYNCH, 2008).

Em relação à sarcopenia, sabe-se que tal processo é relacionado a alterações na arquitetura do músculo-esquelético, tais como, redução do tamanho do músculo, ou seja, os fascículos musculares diminuem seu comprimento e com ângulo de penetração menor (NARICI *et al.*, 2003; MORSE *et al.*, 2005).

Considerando que a arquitetura muscular é determinante para a mecânica muscular, isto é, influencia diretamente na relação comprimento-tensão muscular e força-velocidade (LIEBER e FRIDEN, 2000), o conhecimento das características estruturais do ângulo de penetração, comprimento muscular, espessura muscular e área de secção transversa das fibras musculares são de extrema importância para compreensão dos declínios físicos que ocorrem com o envelhecimento (PEIXINHO *et al.*, 2014).

Além disso, essas alterações são mais pronunciadas na mulher do que no homem e, histologicamente, em ratas anexas, foi observado menor número de miofibrilas, bem como aumento dos espaços interfibrilares, alteração da disposição estrutural das miofibrilas, de poligonais para arredondadas, caracterizando a sarcopenia (MOREIRA *et al.*, 2005). Ainda, em ratas idosas (28-30 meses) a área de secção transversa apresentou-se 30% menor comparada com ratas entre 9-10 meses (HOLLOSZY *et al.*, 1991).

O estresse oxidativo é um dos fatores que desencadeia a apoptose, isso se deve ao desequilíbrio entre as concentrações de oxidação e antioxidação, as quais são características desse processo (KREGEL e ZANG, 2007). Tem sido demonstrado que o envelhecimento aumenta a concentração de estresse oxidativo no músculo-esquelético (SIU e PISTILLI, 2008), o que desencadeia processo inflamatório crônico (HOWARD *et. al*, 2007) e disfunção mitocondrial (MENG e YU, 2010). Ainda em relação a apoptose, existe uma citocina que também pode desencadeá-la e tem sua concentração elevada com o processo de envelhecimento, o TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral- $\alpha$ ), a qual também está presente no processo inflamatório (PHILLIPS e LEEUWENBURGH, 2005).

Além de preditor de mortalidade, o aumento nos processos inflamatórios que ocorrem com o envelhecimento pode ser responsável por várias condições comuns do idoso, como perda óssea, anemia, sarcopenia e, conseqüentemente, síndrome de fragilidade (ROCHA, REIS e TEIXEIRA, 2011).

Um estudo realizado com 3.075 homens e mulheres com idade entre 70  $\pm$  79 anos demonstrou que área de secção transversa dos músculos da coxa e a força de extensão do joelho e de preensão manual apresentaram relação negativa com as concentrações de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1b) (VISSER *et al.*, 2002). Tais achados indicam que maiores concentrações de fatores inflamatórios tendem a produzir reduções sobre a capacidade de produzir força em idosos.

Analisando que a redução da capacidade de produzir força e atrofia muscular em idosos, ocorre tanto na sarcopenia quanto na caquexia, cabe ressaltar a diferença entre estas. De acordo com Hall *et al.* (2011) a sarcopenia é multifatorial e ocorre devido ao processo de envelhecimento, sendo que, questões comuns relacionadas ao envelhecimento, tais como: redução da absorção de aminoácido, que leva a decréscimo da atividade anabólica e conseqüente diminuição da massa muscular, associada a redução da atividade física e atividade dos motoneurônios, contribuem para a atrofia muscular e conseqüente, sarcopenia. Já a caquexia é decorrente de alterações fisiológicas induzidas por doenças (FIGURA 01) (HALL *et al.*, 2011). As citocinas inflamatórias desempenham papel fundamental na indução a sarcopenia e caquexia, sendo que, o processo inflamatório agudo, decorrente de doenças, induz a caquexia e, o processo inflamatório crônico, decorrente do

processo de envelhecimento, leva a sarcopenia (HALL *et al.*, 2011). Sendo que, a caquexia pode induzir a sarcopenia, mas, o contrário não ocorre (HALL *et al.*, 2011).

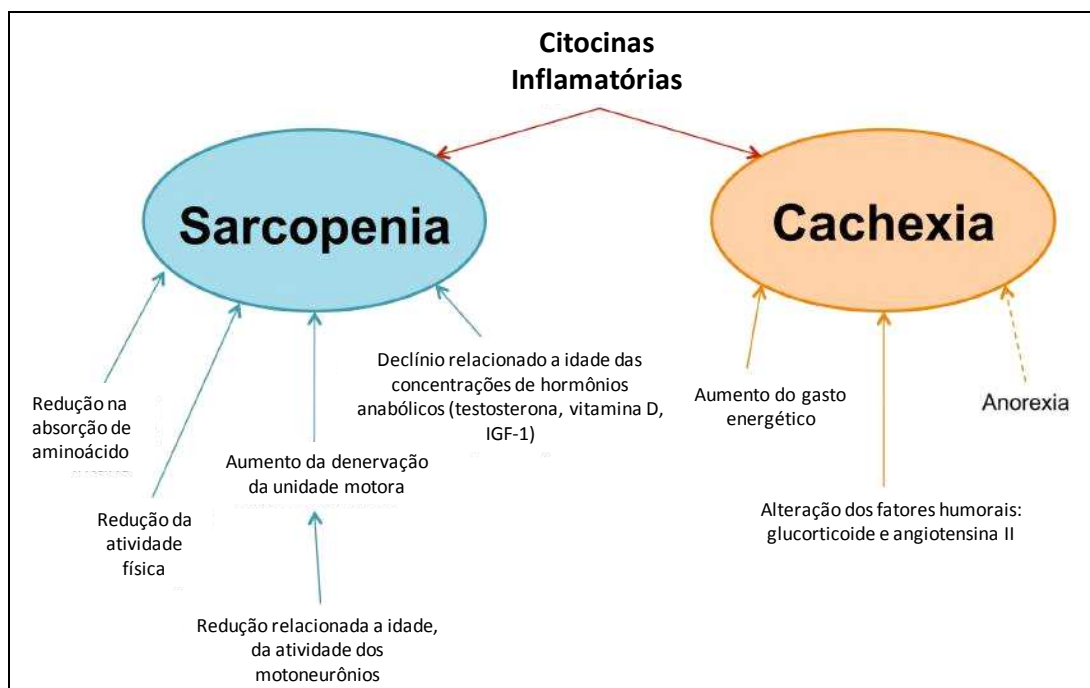


Figura 1: Diferença entre Sarcopenia e Caquexia. Adaptado de Hall *et al.* (2011).

A sarcopenia é mais acentuada nas mulheres a partir da meia idade, devido à menopausa, que está associada à diminuição dos hormônios femininos que induzem alterações no músculo esquelético e ósseo (DIONE, 2000; COOPER, 2008). Com relação ao tecido muscular, ocorrem mudanças nas propriedades contráteis devido a capacidade reduzida de sintetizar novas proteínas e o desequilíbrio entre síntese e degradação das proteínas musculares, aumento do tecido conjuntivo e de gordura intramuscular, diminuição da área de secção transversa das fibras musculares e diminuição do número de receptores de estrôgeno no músculo (KADI *et al.*, 2002; MALTAIS *et al.*, 2009).

Sabe-se que o tecido muscular é envolvido externamente por uma membrana de tecido conjuntivo, chamada epimísio. E, as fibras musculares presentes no músculo são separadas por septos, que agrupam de dez a cem fibras musculares em fascículos, estes septos também oriundos de tecido conjuntivo são chamados de perimísio. Este tem a função de envolver o ventre muscular para proteger e manter

as fibras e fascículos organizados para potencializar a ação muscular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012). Tanto o epimísio quanto o perimísio contém quantidades maiores de fibras de colágeno tipo I (fibras colágenas propriamente ditas) que fibras reticulares (formadas por colágeno tipo III) (KETEYIAN e FOSS, 2000). Cada fibra muscular existente no feixe está envolvida pelo endomísio onde há predomínio de fibras reticulares (KETEYIAN e FOSS, 2000). Nesse sentido, para que ocorra a contração muscular, faz-se necessária interação do sistema não contrátil com sistema contrátil, sendo que, a primeira estrutura a ser atingida mediante estímulo mecânico é a matriz extracelular (DE DEYNE, 2001).

### **2.1.2 Matriz extracelular (MEC) e a regulação do colágeno**

A MEC é constituída por proteínas (colágenos, proteoglicanas e glicoproteínas) organizadas e estruturadas de forma a fornecerem suporte e proteção para as fibras musculares, desempenhando ainda uma função na transmissão de força e resistência elástica ao tecido (KOSKINEN *et al.*, 2002; CARMELI *et al.*, 2005; KJAER, 2004, KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011). Os principais componentes da MEC do músculo esquelético são os colágenos fibrilares do tipo I e III e o colágeno não fibrilar do tipo IV, localizado principalmente na membrana basal muscular (KOSKINEN *et al.*, 2002, CALVI *et al.*, 2012).

Sabe-se que o colágeno no tecido muscular tem uma função estrutural, conectando as fibras musculares para garantir seu alinhamento. O colágeno confere resistência à tração das fibras musculares, mais especificamente, as pontes cruzadas inter e intramoleculares, orientação, densidade, força de atrito entre as fibras e, interações física e química com outros componentes estruturais da MEC (CALVI *et al.*, 2012).

O colágeno é a proteína mais abundante, constituindo 20-25% de todas as proteínas do corpo. Atualmente são conhecidos 19 tipos, predominando nos músculos os dos tipos I, III, IV e V. O tipo I é encontrado principalmente no epimísio e em menor quantidade no perimísio, sendo também localizado na pele, ossos, ligamentos e tendões (TAKALA e VIRTANEN, 2000). Suas fibras são as mais tolerantes ao estresse e apresentam alta força tênsil e limitada elasticidade, sendo, portanto, as mais adaptadas para a transmissão de força (HAN *et al.*, 1999) longitudinal (MATTIELO-SVERZUT *et al.*, 2013), e é predominante no músculo

envelhecido (MATTIELO-SVERZUT *et al.*, 2013; HINDLE *et al.*, 2009). Do aspecto biomecânico, o colágeno tipo I representa a força tênsil durante a aplicação de uma carga na fase elástica e o colágeno tipo III representa a complacência tecidual durante ciclo de deformação tempo-espaço (MATTIELO-SVERZUT *et al.*, 2013).

O colágeno tipo III predomina no perimísio e endomísio (SALONEN *et al.*, 1985), e apresenta estrutura e organização semelhante ao do tipo I, porém, suas fibras são mais elásticas e de menor espessura (HAN *et al.*, 1999). O tipo IV localiza-se na membrana basal, formando um suporte para ela (HAN *et al.*, 1999). No endomísio, encontram-se os tipos I, III e V (KOVANEN, 2002), sendo este último encontrado em menor quantidade, representando 5% do colágeno total (JÓZSA *et al.*, 1990).

Além disso, a relação entre colágeno tipo I e III é considerada mais importante do que suas concentrações absolutas individuais, onde maior concentração do colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I é considerado favorável. Essa proporção afeta as propriedades mecânicas do músculo, potencializando o desempenho e conferindo proteção das miofibrilas contra ferimentos, formando uma estrutura mais favorável para a transmissão das altas cargas (MATTIELO-SVERZUT *et al.*, 2013)

As proteínas da MEC fazem conexão com a fibra muscular por meio das integrinas, que são proteínas presentes na membrana da fibra. Quando o estímulo de tensão é transmitido à MEC conseqüentemente ocorre a ativação das integrinas e então esse sinal é transmitido para dentro da célula. Essa transmissão ocorre pela ativação de uma série de proteínas (“cascata de sinalização”) que atingem o núcleo, e dessa forma alteram a transcrição de genes músculo-específicos, que posteriormente regulam a tradução de proteínas no citoplasma, que pode resultar em um aumento da síntese protéica (DE DEYNE, 2001).

A transmissão de força do complexo músculo-tendão é dependente da integridade estrutural tanto das fibras musculares como da MEC e sua resistência deve-se a interações inter e intra moleculares, orientação, densidade e comprimento das fibras musculares e das de fibras de colágeno (KJAER, 2004). Dessa forma, a quantidade e o tipo de estresse mecânico sobre a MEC podem afetar a síntese e/ou degradação de seus componentes, alterando sua quantidade e qualidade. Nesse

aspecto, sabe-se que exercícios com carga são capazes de aumentar a síntese de colágeno muscular (TAKALA e VIRTANEN, 2000).

Por outro lado, em modelos de imobilização, pode-se observar a diminuição da expressão gênica do colágeno (HAN *et al*, 1999) bem como de sua síntese. Porém quando o músculo é imobilizado em posição de alongamento essa alteração no colágeno não é observada (AHTIKOSKI *et al*, 2003), indicando que a posição de alongamento e o respectivo estresse mecânico causado, parece ser fundamental na resposta de adaptação da MEC frente a imobilização muscular.

Sabe-se que dois fatores de crescimento estão envolvidos na regulação e síntese do colágeno após treinamento concêntrico, excêntrico ou isométrico de ratos: o TGF $\beta$ -1 e o CTGF (HEINEMEIER *et al.*, 2007). Heinemeier e colaboradores (2007) mostraram que após esses treinamentos, a expressão gênica do TGF $\beta$ -1 foi significativamente maior no treino excêntrico quando comparado ao concêntrico, e também apresentou aumento intragrupos. Já o CTGF aumentou sua expressão gênica apenas nos grupos submetidos aos treinamentos excêntrico e isométrico. Dessa forma, sugeriram uma possível conexão entre a expressão gênica dos fatores TGF $\beta$ -1 e CTGF com a tensão gerada durante o aumento do comprimento músculo-tendíneo promovido pelo exercício excêntrico, pois ambos fatores aumentaram significativamente durante este treino. Em contrapartida, quando realizado o treinamento concêntrico em ratos, não houve alteração da expressão gênica do fator CTGF e o TGF $\beta$ -1 não apresentou aumento expressivo (HEINEMEIER *et al.*, 2007).

No músculo-esquelético o aumento da expressão gênica do TGF $\beta$ -1 em humanos foi observado em resposta ao estímulo causado pelo exercício excêntrico (HAMADA *et al.*, 2005), e em ratos tal aumento foi verificado como resposta aguda a exercícios de resistência excêntrica e concêntrica (GAVIN e WAGNER, 2001). Heinemeier e colaboradores (2007) afirmam que o aumento na expressão gênica do TGF $\beta$ -1 está diretamente relacionada com a produção da MEC, induzida pela tensão muscular gerada pelo treinamento excêntrico agudo. O TGF $\beta$ -1 é um importante mediador da síntese de colágeno, a qual é mecanicamente induzida em fibroblastos (YANG *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2013).

Aoki *et al* (2009) encontraram aumento da expressão do gene miostatina em ratos jovens, imobilizados em posição de alongamento durante 24h, verificando que o efeito agudo do alongamento seria a regulação negativa do trofismo muscular.



Miostatina é um regulador negativo do crescimento muscular e pertence à superfamília TGF- $\beta$ . Sabe-se que altas concentrações de TGF $\beta$ -1 no tecido muscular, estão relacionadas a formação de tecido fibrótico, o que prejudica o desempenho muscular levando a atrofia muscular (BURKS e CONH,2011, SMITH *et al.*,2007).

Peviani *et al* (2007) mostraram que única sessão de 10 repetições de alongamento passivo mantido por 1 minuto cada repetição, no sóleo de ratos jovens aumentou os níveis de RNAm da MyoD, miostatina e atrogina-1. Os autores sugerem que tal protocolo de alongamento promoveu modificação nas vias da hipertrofia, pelo aumento da myo-D e da atrofia muscular devido elevação da miostatina e atrogina-1.

A expressão gênica do CTGF, um potente estimulador da síntese de colágeno pode ser aumentada por estímulo mecânico (SCHILD e TRUEB, 2002). Além disso, o CTGF é parcialmente responsável pela indução da síntese de colágeno, agindo em conjunto com o TGF $\beta$ -1 (DUNCAN *et al.*,1999). Seria interessante avaliar se esses fatores também são regulados pelo estímulo de alongamento muscular em idosos.

Além da indução da síntese do colágeno após treinamento, tem sido sugerido também a ocorrência de mudanças na estrutura do colágeno pelo envolvimento tanto do aumento da ligação entre suas fibrilas (KOVANEN *et al.*, 1984; KUBO *et al.* 2002) como da degradação (LANGBERG *et al.*, 2001; OLESEN *et al.*, 2006).

Na regeneração regulada do músculo ocorre resposta inflamatória transitória após a lesão, o que inclui a quimiotaxia dos fatores de crescimento, citocinas, macrófagos e fibroblastos. Isto é seguido pela ativação e proliferação de células satélites. Uma vez ativado, mioblastos diferenciam-se em miócitos e então se fundem a miofibrila, exibindo núcleos centrais. Este processo é principalmente orquestrado pela expressão dos fatores regulatórios miogênicos. Já, na regeneração muscular desregulada, não há resposta inflamatória persistente, entretanto, ocorre superexpressão de proteínas tais como TGF $\beta$ -1 e miostatina, as quais promovem a formação de tecido fibrótico para substituir a miofibrila danificada (FIGURA 2). A regeneração muscular desregulada é uma característica do processo de envelhecimento (BURKS e COHN, 2011).

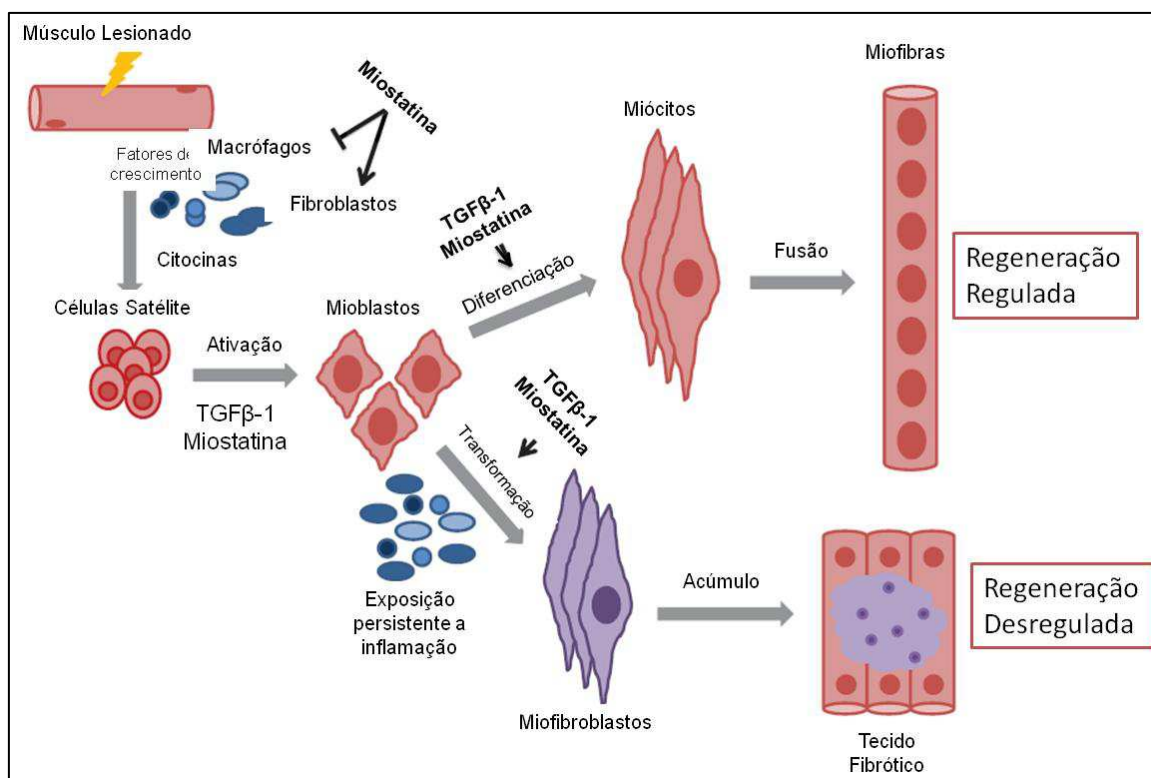


Figura 2: Regulação e Desregulação da Regeneração Muscular. Adaptado Burks & Cohn (2011)

O TGFβ-1, é conhecido por acelerar o crescimento dos fibroblastos devido a suas propriedades fibrinogênicas; é visto como o primeiro fator de indução a fibrose em diversos tecidos lesionados; tem impacto negativo na regeneração muscular, enquanto que em células musculares hígdas, ele está ausente (YAMAZAKI,1994; LI *et al.*, 2004).

Ainda, em relação ao TGFβ-1, Li e colaboradores (2013) avaliaram o papel deste fator na produção de fibrose tecidual pós-contusão muscular em camundongos, verificando que um dos efeitos agudos da contusão muscular é a produção de TGFβ-1, colágeno e fibrose tecidual. Ainda, de acordo com Conte *et al.* (2011) o bloqueio da atividade do TGFβ-1, inibe a proliferação de colágeno.

De acordo com Burks e Cohn (2011), o aumento da atividade de TGFβ-1, contribui para o enriquecimento do tecido conjuntivo dentro da MEC, criando um ambiente que interfere na proliferação e ativação de células satélites e subsequente remodelação. Ainda, Maeda e colaboradores (2011), afirmam que a atividade elevada de TGFβ-1 promove atraso da recuperação muscular pós-lesão.

Portanto, é importante analisar o efeito do exercício de alongamento na modulação do TGFβ-1 e consequentemente, dos colágenos I e III, no músculo de ratas idosas, especialmente devido ao seu envolvimento no processo de fibrose.

### 2.1.2.1 Vias de Sinalização do TGF $\beta$ -1

A superfamília TGF $\beta$  desempenha papel crucial na fisiologia normal e patogênese de diferentes tecidos, como regular o equilíbrio de colágeno na matriz extracelular e modular as respostas inflamatórias (KUSKO *et al.*, 2012). Entretanto, é importante enfatizar que os efeitos desta cascata de sinalização são, frequentemente, tecido-específico, desse modo, ditando quais genes alvo serão ativados em resposta ao sinal de transdução (BURKS e COHN, 2011). Devido a esses multifacetados efeitos nos diferentes tecidos, a desregulamentação da cascata de sinalização deste fator, pode levar ao desenvolvimento de uma infinidade de doenças (BURKS e COHN, 2011).

A superfamília de citocinas TGF $\beta$  é composta por uma variedade de moléculas de sinalização incluindo: isoformas de TGF $\beta$  (1 a 3), proteínas morfogenéticas ósseas (1 a 20) e fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) (BURKS e COHN, 2011; WIPFF *et al.*, 2007).

A isoforma TGF $\beta$ -1 está envolvida no controle da remodelação da matriz extracelular (GUO e WANG, 2009). O TGF $\beta$ -1 é sintetizado como um precursor que é clivado (dividido), no meio intracelular, em um complexo inativo composto por TGF $\beta$ -1 maduro com porção não-covalente de um peptídeo precursor, denominado peptídeo associado a latência (PAL) (BURKS e COHN, 2011). E, sua ativação ocorre a nível extracelular, sendo que, ao ser ativado o TGF $\beta$ -1 pode interagir com os receptores tipo I (T $\beta$ R-II) e tipo II (ALK) (FIGURA 3). O receptor tipo II constitutivamente ativo fosforila (ocorre adição de um grupo fosfato para participação na regulação de proteínas) e ativa o receptor Smad (R-Smad) tipo I, que por sua vez fosforila diretamente Smad2 Smad3 (que são recrutados por proteínas adaptadoras) para a transdução de sinal iniciar através de cascatas canônicas (SMITH *et al.*, 2007; BURKS e COHN, 2011). Uma vez R-Smad tenha sido fosforilada, forma um complexo com o mediador comum Smad (co-Smad), Smad4, que transloca para o núcleo, onde se liga diretamente a elementos definidos no DNA (FIGURA 3) (BURKS e COHN, 2011).

O TGF $\beta$ -1 também pode sinalizar através da indução de vias não-canônicas incluindo MAPK. A família MAPK consiste em isoformas de quinases com sinal

extracelular regulado. Os mecanismos de ativação da MAPK pelo TGF- $\beta$ 1 e as consequências biológicas são dependentes do tipo específico de célula. A miostatina (MSTN) regula negativamente o crescimento muscular, é predominantemente expressada no músculo esquelético pela via de sinalização do TGF $\beta$ -1 (WIPFF *et al.*, 2007). Um estudo demonstrou que a miostatina induz a ativação da sinalização de MAPK, e inibe a via de sinalização AKT/TORC1/p70S6K, podendo provocar atrofia muscular (LEE, 2004).

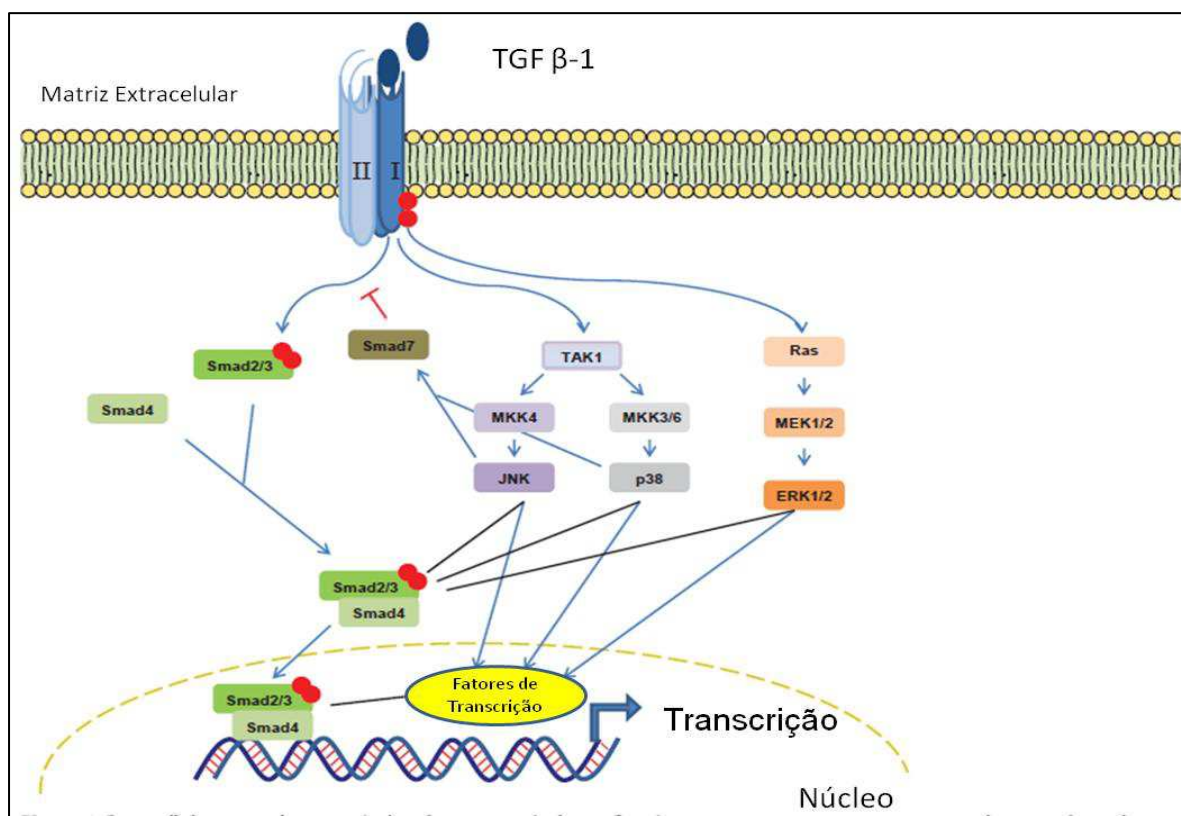


Figura 3– Via de sinalização do TGF $\beta$ -1.: I-R-Smad tipo I; II- R-Smad tipo II; TAK – TGF $\beta$ -1 quinase-ativada; JNK – c-Jun N- quinase terminal; ● ligante do TGF $\beta$ -1; — Smad 7 envolvido com R-Smad tipo I; —→ vias de sinalização percorridas pelo TGF $\beta$ -1; — via percorrida pelo ligante do TGF $\beta$ -1. Adaptado de Burks e Cohn (2011).

O TGF $\beta$ -1 se expressa no tecido conjuntivo durante a miogenese, sendo que esta expressão é correlacionada a composição do tipo de fibra que circunda os miotubos. Estes miotubos formados após a expressão do TGF $\beta$ -1 evoluem para fibras lentas (McLENNAN, 1993).

Este fator de crescimento tecidual tem sido associado a efeitos negativos na regeneração de músculo adulto maduro, devido a inibição da proliferação de células satélites, fusão de miofibras e expressão de alguns genes músculo-específicos

(ALLEN e BOXHOM,1987). Além disso, o TGF $\beta$ -1 induz as células miogênicas transformarem-se em células fibróticas após lesão (LI *et al.*,2005), e estimula a síntese de colágeno no tecido muscular (SMITH *et al.*, 2007).

Smith e colaboradores (2007) avaliaram o comportamento da expressão do TGF $\beta$ -1 no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a lesão e posteriormente a contração tetânica associada a alongamento (50 repetições com 40 segundos de intervalo entre cada repetição), e, após 48h não verificaram alteração na expressão de TGF $\beta$ -1. Dessa forma sugeriram que o TGF $\beta$ -1 possa ter internalizado rapidamente por um ligante, o que impossibilitou a detecção de sua forma ativa.

Foi demonstrado que a contração ativa de miofibroblastos, libera o TGF $\beta$  latente da MEC de fibroblastos cultivados (WIPFF *et al.*, 2007). O que em condições de homeostasia, suporta a ligação funcional entre força mecânica e TGF $\beta$  ativo (MAEDA *et al.*, 2011). Porém, com lesão tecidual, os limites do tecido são rompidos, comprometendo a integridade da MEC, levando ao desequilíbrio mecânico e alteração no mecanismo de mecanotransdução (MAEDA *et al.*, 2011). Esse desequilíbrio mecânico, também é evidenciado durante o processo de envelhecimento (WU *et al.*,2011).

Assim, no próximo item será detalhado o processo de envelhecimento da MEC.

### **2.1.3 Envelhecimento da MEC**

O processo de envelhecimento deteriora as propriedades mecânicas do tecido muscular, o que contribui para a perda da função e independência dos idosos (TRAPPE, 2009). Tal deterioração das propriedades mecânicas do músculo é atribuída à redução da massa muscular e das proteínas contráteis. Além disso, a perda de força muscular relacionada a redução da massa muscular, e mudanças na matriz extracelular (MEC), também contribuem para o processo de declínio das propriedades mecânicas (TRAPPE, 2009; NARICI e MAFFULLI, 2010; KRAGSTRUP, KJAER, MACKEY, 2011).

As mudanças estruturais, bioquímicas e celulares da MEC, levam ao aumento da rigidez muscular e consequente redução da função com o envelhecimento. A concentração de colágeno, de mediadores enzimáticos das ligações cruzadas de colágeno e de produtos finais de glicação avançada (AGE), parecem levar ao

aumento da deposição de colágeno no músculo idoso . Essas concentrações também estão relacionadas à alteração nas proporções de colágeno tipo I e III no músculo idoso (KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011; MATTIELLO-SVERZUT *et al.*, 2013). Além disso, o envelhecimento da MEC está associado à alteração da mecanotransdução, redução da ativação de células satélites e retardo das respostas quimiotáticas inflamatórias (KRAGSTRUP,KJAER e MACKEY,2011). A figura 4 exemplifica o mecanismo de envelhecimento da MEC no musculo-esquelético.

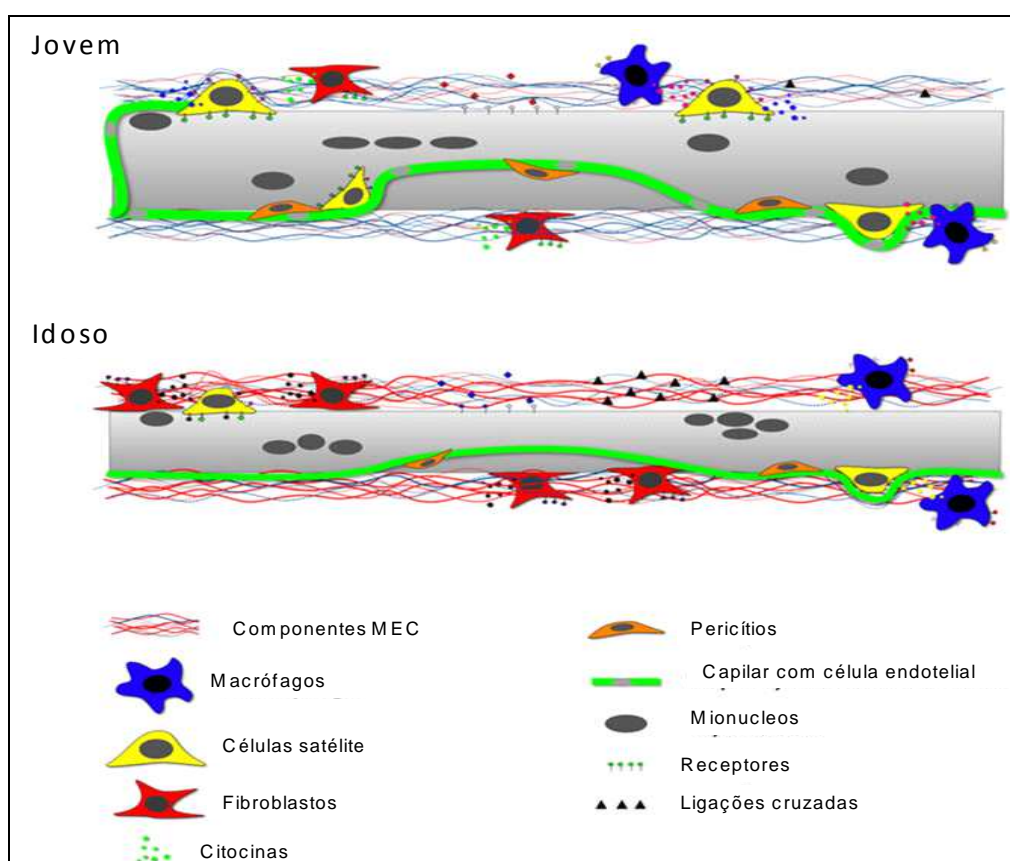


Figura 4: Mudanças da MEC com o processo de envelhecimento. As linhas em vermelho representam deposição de colágeno I na MEC; Linhas azuis representam deposição de colágeno III na MEC. Adaptado Kragstrup, Kjaer e Mackey (2011).

Kodama e colaboradores (2012) avaliaram os efeitos da imobilização e remobilização nas propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratos adultos (com 5 meses) e idosos (com 15 meses). O protocolo do estudo consistiu em: período de imobilização em encurtamento da pata esquerda, de 7 dias; remobilização livre (andar na gaiola) por sete dias ou após dois dias de remobilização livre, um grupo de animais foi submetido a cinco sessões diárias, com 25 minutos cada, durante 5 dias, de exercícios aquáticos (natação). Após este

período, os animais foram ortotansados e o músculo gastrocnêmio foi submetido a ensaio de tração mecânica, sendo avaliados, a carga, alongamento no limite máximo e rigidez. Os autores verificaram que a imobilização foi capaz de induzir alterações nas propriedades mecânicas, reduzindo a capacidade do músculo de suportar cargas tanto nos animais adultos como nos idosos, sendo que no grupo de ratos idoso essas alterações foram significativamente maiores. E ainda, no grupo idoso, a remobilização livre não demonstrou efeitos no curto período pós-imobilização e a remobilização por meio de exercício físico apresentou uma tendência ao aumento da carga, que não foi suficiente para restabelecê-la aos níveis de normalidade. Dessa forma, concluíram que o fator idade ou envelhecimento pode interferir de maneira negativa na resposta de recuperação do tecido muscular no que diz respeito à propriedade mecânica de alongamento no limite máximo no período pós-imobilização.

Neste sentido, Järvinen e colaboradores (2002) demonstraram alterações na organização e nas características estruturais das fibras de colágeno, como aumento do número de fibras orientadas perpendicularmente, fibras mais estreitas, numerosas e menos resistentes à tensão em ratos jovens submetidos a imobilização dos músculos gastrocnêmio, sóleo e tibial anterior. De um modo geral, as alterações quantitativas e qualitativas no tecido conjuntivo intramuscular, decorrentes da imobilização, podem contribuir para a redução das propriedades biomecânicas do músculo esquelético imobilizado.

Segundo Abdalla *et al.* (2009), o exercício induz o alinhamento funcional das fibras colágenas e Stone (1988) afirma que o exercício físico resistido pode aumentar a resistência do tecido conjuntivo e a massa muscular, tornando o músculo mais resistente.

De acordo com Kamikawa e colaboradores (2013) o exercício de alongamento repetitivo, afeta continuamente a mudança da conformação da matriz extracelular, e o exercício de alongamento contínuo, afeta o estímulo mecânico da MEC em uma única vez. Dessa forma, verificaram que o alongamento repetitivo foi mais eficaz do que alongamento contínuo, pois, funciona como forma cumulativa. Neste estudo, foram utilizados 2 grupos de camundongos, onde, um grupo realizou alongamento balístico passivo manual, com 15 repetições por minuto, com duração total de 15 minutos, realizado diariamente no músculo gastrocnêmio direito, durante

uma semana. E, o outro grupo, realizou o mesmo protocolo 4 vezes por semana, durante uma semana. Apesar das diferenças apontadas entre o alongamento passivo repetitivo e contínuo, os autores afirmam que o exercício de alongamento passivo, independente do protocolo realizado, é útil para a prevenção e manutenção do trofismo muscular (KAMIKAWA *et al.*, 2013).

As mudanças funcionais decorrentes do envelhecimento da MEC não foram estudadas somente em relação à rigidez, mas também sobre a transmissão lateral de força, força isométrica, potência e tensão ativa (KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011).

Alnaqeeb *et al* (1984) constataram que o músculo idoso apresenta exponencial diminuição na tensão ativa com envelhecimento e Haus *et al* (2007) demonstraram redução na força isométrica máxima e potência. Além disso, Alnaqeeb *et al* (1984) encontraram aumento da rigidez muscular correlacionada ao aumento da concentração de colágeno, sugerindo relação positiva entre rigidez-colágeno-MEC.

Segundo Kragstrup, Kjaer e Mackey (2011), as alterações na MEC que acontecem com o processo de envelhecimento, contribuem para a deterioração da função muscular. Ainda, Ramaswamy *et al.* (2011) verificaram que durante o envelhecimento do músculo esquelético, o acúmulo de componentes da lâmina basal e tecido conjuntivo estão diretamente relacionados com a redução de degradação das proteínas da MEC, o que contribui para a rigidez muscular.

Sendo assim, é importante o estudo de intervenções que visem minimizar tais alterações, a fim de manter a funcionalidade muscular do idoso.

## **2.2 Mecanismo de Mecanotransdução**

A mecanotransdução se refere ao processo pelo qual o corpo converte um estímulo mecânico em resposta celular (KHAN e SCOTT, 2012; GUSMÃO e BELANGERO, 2009). Esta resposta celular promove mudanças estruturais no músculo. O exercício físico atua como estímulo mecânico, o qual promove perturbação física para as células, que é transformada em variedade de sinais químicos intra e extra celulares (KHAN e SCOTT, 2012).



As reações bioquímicas em cadeia, induzidas pelo estímulo mecânico atuam em nível celular e podem causar inibição da apoptose, aumento da proliferação celular, alteração na migração celular, entre outros efeitos (GUSMÃO e BELANGERO, 2009).

O estímulo mecânico gerado pelo alongamento muscular é transmitido para a fibra muscular através da MEC, passando pelo sarcolema, atingindo moléculas intracelulares e o sistema contrátil (FIGURA 5) (DE DEYNE, 2001; SHAH *et al.*, 2004; SALVINI *et al.*, 2012). De Deyne (2001) descreveu que as interações entre o sistema não contrátil e o sistema contrátil ocorrem na seguinte sequência:

1. fibras colágenas (matriz extracelular); 2. glicoproteínas (laminina, fibronectina); 3. fosforilação de proteínas integrais de membrana, como integrina e distroglicanas; 4. ativação do complexo do citoesqueleto, constituído por proteínas do costâmero, tais como: talina, vinculina, desmina, distrofina, b-espectrina e outras; 5. citoesqueleto não contrátil, como a-actinina e filamentos intermediários; 6. sistema contrátil.

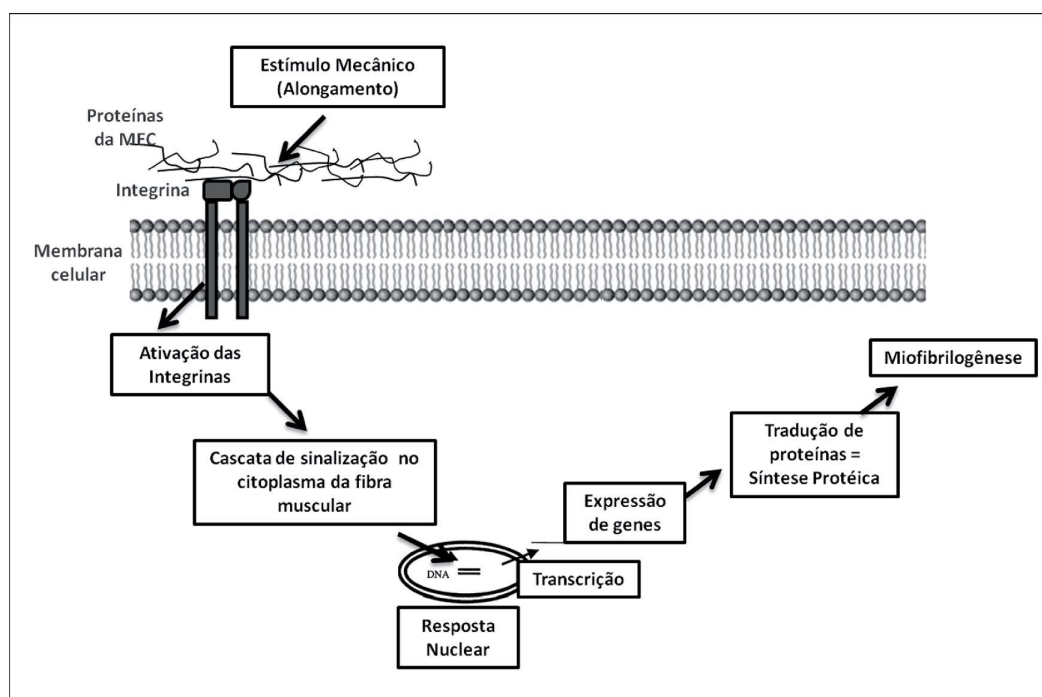


Figura 5: Mecanismo de mecanotransdução celular. O estímulo de tensão promovido, por exemplo, pelo alongamento, é transmitido aos componentes da MEC que por sua vez ativam as integrinas de membrana. Essa ativação promove uma cascata de sinalização intracelular, alterando a transcrição de genes musculoespecíficos que regulam a tradução de proteínas e a miofibrilogênese (SALVINI *et al.*, 2012).

Segundo Salvini e colaboradores (2012), é pelo mecanismo de mecanotransdução que um estímulo mecânico causa uma série de alterações intracelulares, como o aumento da síntese proteica e, conseqüentemente, da força muscular e da amplitude articular.

O estímulo mecânico imposto ao músculo, durante o alongamento se dissipa no sentido longitudinal e lateral das fibras musculares. Street (1983) verificou que 80% da transdução de força ocorre no sentido lateral (de miofibrila para miofibrila), ocorre através de estruturas identificadas como costâmeros, as quais estão associadas às linhas Z. Dessa forma, sugere-se que a transmissão de força, que ocorre no sentido longitudinal, atinja por último a regiãomiotendínea, por isso são descritos altos índices de lesões nessa região durante a sobrecarga (BEST *et al.*, 1994). No costâmero, encontram-se importantes proteínas, como a distrofina, espectrina, anquirina, vinculina, distroglicanas e certas integrinas, que também estão presentes na junçãomiotendínea, por isso o importante papel do complexo do costâmero na transdução do sinal.

Durante cada tipo de contração: concêntrica, isométrica e excêntrica, a transmissão de força lateral estabiliza o comprimento dos sarcômeros e força da fibra para o epimísio (STREET, 1983). Estas ligações para transmissão da força lateral são críticas durante cada tipo de contração, mas é expressivamente crítica durante a contração excêntrica, quando as forças são mais desenvolvidas quando comparadas com a contração isométrica (LI *et al.* 2006).

Algumas proteínas do costâmero, como a distrofina, distroglicanas e integrinas estão envolvidas nas ligações entre a MEC e o citoesqueleto, as quais contribuem significativamente na via de transmissão de força lateral (GUSMÃO e BELANGERO, 2009).

Têm-se descrito que as integrinas, glicoproteínas transmembrana que mantêm as interações do citoplasma com a MEC e com outras células, desempenham importante papel na captação do sinal mecânico e transmissão para o citoplasma e ativação de uma cascata de reações (SHAH *et al.*, 2004). Além disso, é dito que a região das integrinas é considerada a mais importante para a mecanotransdução. Ainda, possuem papel de integrar o interior da célula (citoesqueleto) com a MEC, e as diferentes combinações de suas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  determinam a especificidade de ligação das integrinas aos componentes da MEC, do citoesqueleto e proteínas citoplasmáticas (GUSMÃO e BELANGERO, 2009).

Os eventos desencadeados pela ativação das integrinas após o estímulo mecânico incluem: alterações da expressão de alguns genes e de fatores de crescimento, bem como na proliferação, diferenciação e apoptose (CLARK e BRUGGE, 1995; SCHWARTZ *et al.*, 1995).

Acredita-se que, após a deformação mecânica da membrana plasmática, ocorre alteração conformacional das integrinas, criando, em sua estrutura química, sítios de alta afinidade para reações químicas, resultando em ligações com outras integrinas e componentes do citoesqueleto. Em outras palavras, o estímulo mecânico funciona como uma enzima, que catalisa a reação bioquímica (GUSMÃO e BELANGERO, 2009).

A transmissão do sinal, através da interação da integrina com a MEC, inicialmente ocorre pela formação de um complexo de adesão focal, que envolvem proteínas como a vinculina, talina,  $\alpha$ -actinina, as quais são necessárias para que ocorra a ligação entre as integrinas e o citoesqueleto (HOSHIJIMA *et al.*, 1998). Em músculo mantido em posição de alongamento ocorre aumento do complexo de adesão focal e subsequente fosforilação de quinase de adesão focal (FAK), um dos sinais iniciais para a transdução do sinal mecânico (FLUCK *et al.*, 1999). Assim, o complexo de adesão focal pode ser considerado como um sítio “chave” de captação de sinais durante os estímulos mecânicos que induzem a hipertrofia muscular (FLUCK *et al.*, 1999).

Várias moléculas de sinalização estão conectadas com as integrinas, tais como: quinase de adesão focal (FAK); proteína quinase C, proteínas quinase ativadora de mitógeno, fosfatidilinositol-3 quinase (PI-3 Kinase); Ras e Rho (GUSMÃO e BELANGERO, 2009).

Carson e Wei (2000) relataram aumento da atividade das FAKs em músculos de ratos submetidos ao alongamento contínuo, atribuindo as FAKs um importante papel como regulador do crescimento celular (hipertrofia). Têm sido postulado que a Rho é uma forte candidata a mediar a integração de estímulos, regulando fatores de crescimento local e transcrição, principalmente na primeira semana de imobilização na posição de alongamento (CARSON e BOOTH, 1998). Estudos mostram que a proteína Rho está envolvida na ativação do fator de resposta ao soro (SRF), os quais, quando ativados (Rho e SRF) aumentam a expressão do fator regulatório miogênico myo-D, envolvido nos processos de desenvolvimento, diferenciação,

regeneração e hipertrofia musculares (SABORIN e RUDNICKI, 2000; CARNAC *et al.*, 1998).

Outras duas proteínas, a CARP e a Ankrd2 (também conhecida como Arpp), estão envolvidas na transdução do sinal do sarcômero para o núcleo, quando o músculo é submetido a estresses, como alongamento e denervação (KOJIC *et al.*, 2004; KEMP *et al.*, 2000). Tem sido demonstrado que a Ankrd2, proteína sarcomérica encontrada na banda I, forma um complexo com a telotonina (proteína ligadora de titina), titina, miopalinina e calpaína protease p94, a qual atua como sinalizador e regulador da expressão de genes, como p53 (responsável pela diferenciação de mioblastos), em resposta ao estresse muscular, se comportando como um mensageiro molecular entre o citoplasma e o núcleo (KOJIC *et al.*, 2004). Em músculos submetidos ao alongamento contínuo, foi encontrado aumento na expressão do gene da Ankrd2. Assim, pode-se concluir que a linha Z não atua apenas ancorando proteínas e sim como uma estrutura sinalizadora de estresse muscular, fazendo a transdução de sinais entre o sarcômero e o núcleo (BEAN *et al.*, 2008; KOJIC *et al.*, 2004).

Wipff e colaboradores (2007) demonstraram que a contração ativa de miofibroblastos, libera o TGF $\beta$  latente da MEC de fibroblastos cultivados. Isto suporta a ligação funcional entre força mecânica e TGF $\beta$  ativo, em condições de homeostasia, cada célula detecta sinais mecânicos dentro de uma gama distinta de magnitude (MAEDA *et al.*, 2011). E, após a lesão tecidual os limites do tecido se desintegram e a arquitetura da MEC foi consideravelmente interrompida, causando desequilíbrio mecânico para as células e alteração no mecanismo de mecanotransdução (MAEDA *et al.*, 2011). Esse desequilíbrio mecânico, também foi evidenciado durante o processo de envelhecimento (WU *et al.*, 2011).

### 2.3.1 Efeitos do Envelhecimento no Mecanismo de Mecanotransdução

A manutenção da massa muscular e funcionalidade refletem diretamente na qualidade de vida dos idosos (WU *et al.*, 2011). Como descrito anteriormente, a sarcopenia é caracterizada pela diminuição da massa muscular e tem forte correlação com a redução da força muscular.

A carga mecânica e a atividade contrátil desempenham papel fundamental na regulação da massa muscular e, alterações na descarga de peso podem levar a

remodelação estrutural do músculo (WU *et al.*, 2011). Apesar de alguns estudos em humanos e animais demonstrarem que o músculo envelhecido mantém a capacidade de hipertrofiar, a resposta deste músculo aos estímulos mecânicos é diminuída (CARSON *et al.*, 1996; BLOUGH e LINDERMAN, 2000; PEHME *et al.*, 2004; KOSEK e BAMMAN, 2008).

Além disso, a membrana celular do músculo idoso tem maior propensão a lesões mecanicamente induzidas (RICE *et al.*, 2006). De acordo com Wu e colaboradores (2011), ainda não está esclarecida se esta propensão é relacionada ao complexo glicoproteína-distrofina ou a outras estruturas. Entretanto, entender o mecanismo de mecanotransdução no músculo idoso, auxilia na prescrição de exercícios e estratégias que visem prevenir e tratar as disfunções musculoesqueléticas decorrentes do processo de envelhecimento (FIGURA 6).

Quando o músculo é submetido à tensão passiva, a transdução molecular vem do aumento da AKT/proteína kinase B (uma serina/treonina kinase) que é importante componente sinalizador da regulação do metabolismo celular, crescimento e sobrevivência de vários sistemas. O músculo pode adaptar-se ao alongamento passivo por meio da fosforilação de kinases e por meio de fatores de crescimento secretados pela própria célula (DE DEYNE, 2001).

Contudo, durante o processo de envelhecimento, a expressão gênica basal dos fatores mecânicos de crescimento (MGF – fator de crescimento mecânico; IGF – fator de crescimento insulínico) está reduzida, enquanto que, a via de expressão gênica TGF $\beta$ /Miostatina está aumentada, fato que, potencializa a deposição de colágeno e tecido fibrótico no músculo (LI *et al.*, 2013). Além dessas alterações no mecanismo de mecanotransdução, ocorre aumento na fosforilação basal do MAPK, enquanto a atividade da Akt é reduzida (WU *et al.*, 2011), isto reflete negativamente na adaptação do músculo esquelético idoso ao estímulo mecânico, por exemplo, no decréscimo da hipertrofia mecanicamente induzida (WU *et al.*, 2011).

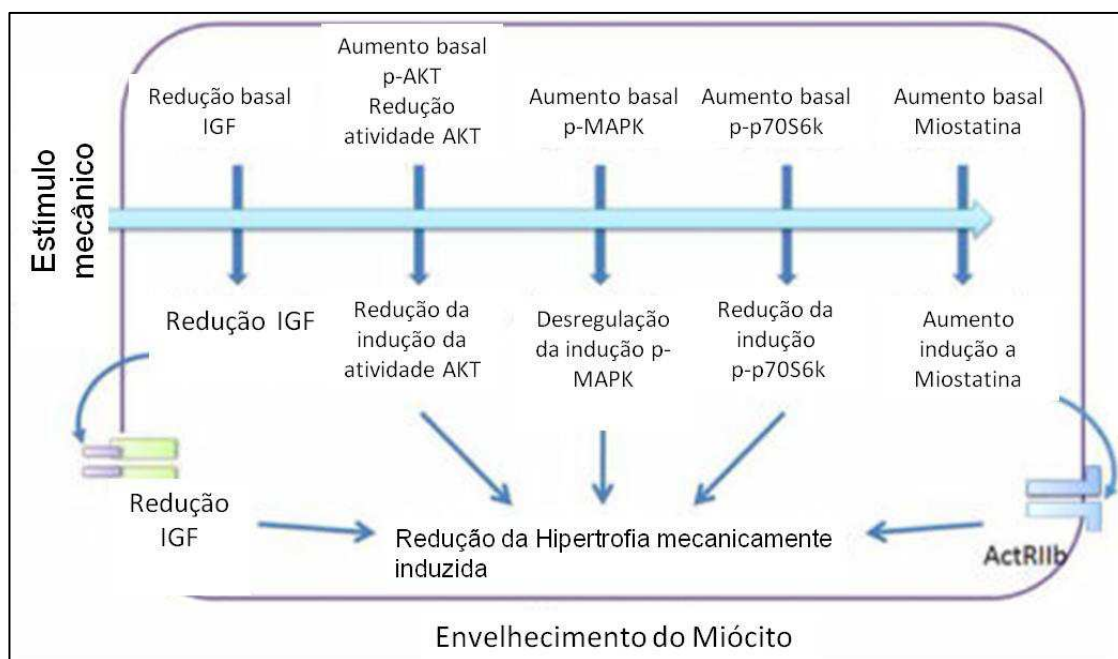


Figura 6: Mecanotransdução desregulada devido a processo de envelhecimento. IGF – fator de crescimento insulínico; p-AKT – proteína quinase B fosforilada; AKT – proteína quinase B; MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno; p-p70S6k – fosfo –p70 quinase S6; ActRIIb – receptor de activina tipo II. Adaptado de Wu et al. (2011).

Tais alterações relacionadas as vias de sinalização de fatores mecânicos de crescimento muscular promovem mudanças mecânicas no músculo idoso, o que aumenta a vulnerabilidade à lesão. De acordo com Ramaswamy e colaboradores (2011), a transmissão de força lateral diminuiu em ratos idosos (com 30-33 meses) quando comparados com ratos jovens (3 meses), e em ratos muito idosos (com 36-38 meses) quando comparados com ratos idosos. Além disso, esses autores demonstraram decréscimo na expressão gênica da distrofina e espessamento da lâmina basal de ratos muito velhos. Neste sentido, é proposto que a transmissão de força lateral atua na proteção do músculo contra lesões e é importante para recuperação pós-lesão (BLOCH e GONZALES-SERRATOS, 2003). Dessa forma, o decréscimo na transmissão de força lateral contribui para o aumento da vulnerabilidade muscular a lesão e, para um retardo no processo de recuperação muscular pós-lesão pode ser verificado em idosos. Isto sugere que o decréscimo na transmissão de força lateral em idosos, ocorre pela deterioração das propriedades musculares mecânicas, o que pode ser decorrente de mudanças na interação entre as fibras musculares esqueléticas e a MEC (KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011).

Decréscimos da contração muscular contribuem para redução da transdução de força, o que leva a alterações na estrutura contrátil, proteínas não-contráteis e tecido conjuntivo intra e extramuscular. Assim, a reversão dessas alterações depende de estímulo externo, como mobilização precoce e exercício de alongamento passivo (CAÇÃO-BENEDINI *et al.*, 2014).

Dessa forma, é importante investigar o efeito do estímulo mecânico proporcionado pelo exercício de alongamento no músculo idoso.

## **2.4 Prescrição de Exercícios de Alongamento para Idosos**

Estudos indicam que exercícios de alongamento podem incrementar o rendimento em práticas esportivas em adultos jovens (SHIER, 2004; KOKONEN *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2007); melhorar a dor musculoesquelética relacionada ao trabalho em adulto (MARANGONI *et al.*, 2010); aumentar a flexibilidade e o torque em idosos da comunidade (BATISTA *et al.*, 2009); incrementar o comprimento músculo-tendíneo, flexibilidade e prevenir perda de torque em idosos institucionalizadas (GALLON *et al.*, 2011). No entanto, na literatura que reporta os efeitos dos exercícios de alongamento apresenta muita variação nos parâmetros para sua prescrição e às vezes ausência de grupo controle e randomização.

Em relação aos efeitos promovidos pelo exercício de alongamento muscular, estes podem ser divididos em agudos e crônicos. Considera-se efeito agudo do alongamento muscular resultados imediatos e em curto prazo, ou seja, quando promove alongamento do componente viscoelástico da unidade músculo-tendínea, o que por sua vez aumenta a ADM e a tolerância ao alongamento (KOKKONEN *et al.*, 1998, NELSON *et al.*, 2005; KOKKONEN *et al.*, 2007, BARANDA e AYALA, 2010). Ainda em relação aos efeitos agudos do exercício de alongamento, são considerados agudos os efeitos que duram por segundos, minutos e horas após a intervenção (TAYLOR *et al.*, 1990; SHIER, 2004; RYAN *et al.* 2008; WEPPLER e MAGNUSSON, 2010) ou até uma semana (KAMIKAWA *et al.*, 2013).

Já os efeitos crônicos representam os resultados tardios do alongamento e podem levar a aumento do comprimento muscular por adaptação mecânica (KOKKONEN *et al.*, 2007, BARANDA e AYALA, 2010), o que pode induzir ao

aumento do número de sarcômeros em série, área de secção transversa das fibras musculares, deformação viscoelástica e alteração da relação comprimento-tensão, tais efeitos podem durar dias, semanas e meses (COUTINHO *et al.*, 2004; GAJDOSIK *et al.*, 2005; SECCHI *et al.*, 2008; WEPPLER e MAGNUSSON, 2010).

Quando se prescreve exercícios deve-se considerar, o tipo de exercício, tempo de manutenção do estímulo, o intervalo entre as repetições, o número de repetições, a frequência diária e semanal e a faixa etária, pois, esses parâmetros influenciam nos efeitos do programa de alongamento, sejam agudos ou crônicos (ZOTZ *et al.*, 2014). Alguns estudos têm investigado os efeitos do alongamento, com diferentes tempos de execução, na amplitude de movimentação articular na população idosa (ZAKAS *et al.*, 2005; FELAND *et al.*, 2001b).

Ao investigar o efeito agudo do exercício de alongamento na população idosa Zakas e colaboradores (2005) não encontraram diferenças nos ganhos de amplitude de movimento articular, ao comparar três protocolos, sendo: 4 repetições com duração de 15 segundos cada, 2 repetições com duração de 30 segundos cada ou 1 repetição com duração de 60 segundos. No entanto, quando foi investigado o efeito crônico do alongamento em idosos institucionalizados entre 75 e 95 anos, a duração da manutenção do estímulo de alongamento com 60 segundos mostrou maior efetividade para o ganho de amplitude de movimento articular e para a manutenção desse ganho, quando comparados a programas que utilizaram 15 e 30 segundos de duração (FELAND *et al.*, 2001b). Estes achados demonstram que a adaptação muscular ao alongamento difere entre os efeitos agudos e crônicos.

Ainda em relação aos efeitos agudos do exercício de alongamento no músculo esquelético de idosos, foi verificado que um repetição de alongamento estático com manutenção de 32 segundos foi suficiente para melhorar a flexibilidade em mulheres e homens idosos praticantes de atividade física (FELAND, MYRER e MERRILL, 2001). E, quando aplicado protocolo de alongamento composto por uma série, com 3 repetições, com 30 segundos de manutenção e 30 segundos de intervalo entre cada repetição em idosos, tal protocolo apresentou como efeito agudo a melhora em algumas variáveis da marcha como: menor pico de inclinação da pelve, maior pico de extensão e amplitude total de movimento da articulação do



quadril, o que de acordo com os autores tornou o padrão da marcha destas idosas similar a marcha de jovens (CRISTOPOLISKI *et al.*, 2008).

Tem sido reportado que a diminuição da rigidez músculo-tendínea, induzida pelo efeito agudo de uma única sessão de alongamento, pode retornar aos valores iniciais em até 20min (RYAN *et al.*, 2008). Portanto, quanto a regularidade que o treinamento com exercícios de alongamento deve ser realizado, o ACSM tem recomendado entre 2 a 3 vezes por semana para incrementos na flexibilidade; para ganhos mais expressivos recomenda-se 5 vezes por semana; e para manutenção 1 vez por semana (ACSM, 2011).

O incremento da ADM de dorsiflexão observada por Gajdosik *et al.* (2005) e Christiansen (2009) confirma as recomendações do ACSM sobre a frequência semanal, que indica entre 2 a 3 vezes por semana, para realização de alongamento (ACSM, 2011). Sobre o número de vezes que o protocolo de alongamento deve ser realizado por dia, em adultos jovens avaliou-se o efeito do alongamento realizado uma ou 3 vezes por dia, e não foi detectada diferença estatisticamente significativa, quando a frequência diária foi aumentada (BANDY *et al.*, 1997).

Stanziano *et al.* (2009) utilizaram o protocolo constituído por 10 repetições de alongamento, mantidas por 5 segundos cada repetição, totalizando 50 segundos para cada grupamento muscular alongado (flexores/abdutores/extensores da articulação do ombro, extensores/abdutores da articulação do quadril; flexores laterais; rotadores e flexores do tronco; flexores plantares do tornozelo); cadeia cinética fechada; realizado uma vez ao dia, 2 vezes por semana; durante 8 semanas; sendo que para avaliação do desfecho foi utilizado o teste de 50 passos para velocidade da marcha. Estes autores verificaram que o programa de alongamento melhorou tanto a ADM quanto a mobilidade e funcionalidade dos idosos institucionalizados.

Cristopoliski *et al.* (2009) reportaram protocolo de exercícios de alongamento realizando 4 repetições de 60 segundos cada; para os grupamentos musculares de extensores de quadril e dorsiflexores; totalizando 240 segundos para cada grupamento muscular; cadeia cinética fechada realizado 3 vezes por semana, durante 12 semanas. O método de avaliação dos parâmetros da marcha foi por vídeo, utilizando 4 câmeras digitais (JVC, GR-D250). Dessa forma, concluíram que o

protocolo proposto estimulou melhora na execução da marcha em idosas da comunidade.

Watt *et al.* (2011) apresentaram o seguinte protocolo de alongamento: 1 série de 4 repetições de 60 segundos cada repetição, com intervalo de 60 segundos entre cada repetição; cadeia cinética fechada para os músculos flexores uniarticulares do quadril, realizados diariamente, durante 10 semanas. O método de avaliação da velocidade da marcha foi o sistema *VICON*. Em outro estudo dos mesmo autores (WATT *et al.* 2011-a), foram utilizados o mesmo protocolo de alongamento, grupamento muscular e método de avaliação do desfecho, entretanto, o estudo foi conduzido com idosos frágeis da comunidade, em ambos estudos observou-se melhora na execução da marcha após protocolo de exercícios de alongamento.

No artigo de Gajdosik *et al.* (2005) foi prescrito alongamento passivo, realizado em dinamômetro isocinético (5°/s), 1 vez ao dia, 1 série de 10 repetições com 15 segundos de duração cada, realizado 3 vezes por semana. No estudo de Christiansen, (2008) o protocolo de alongamento estático em cadeia cinética fechada, constituiu-se de 3 repetições de 45s cada; 2 vezes por dia, diariamente. No que se refere ao aumento da ADM de dorsiflexão, resultado da prática regular de exercícios de alongamento, independentemente do protocolo utilizado, foi observado aumento significativo na amplitude de movimento de dorsiflexão (GAJDOSIK *et al.*, 2005; CRISTIANSEN, 2008).

Batista *et al.* (2009) verificaram que o alongamento muscular, 7 repetições de 1min cada, duas vezes por semana, durante 4 semanas, aumentou 45% a ADM de flexores de joelho, e melhorou a mobilidade funcional em idosas da comunidade. Da mesma forma, Christiansen (2008) verificou que o alongamento muscular, também realizado duas vezes por semana em idosos da comunidade, com três repetições de 45 segundos cada, durante 8 semanas, aumentou em 11% a ADM da dorsiflexão e ainda houve incremento na velocidade da marcha. Ao comparar os resultados destes estudos verifica-se que quando o exercício de alongamento foi praticado por apenas 4 semanas, apenas 2 vezes por semana, já foi suficiente para aumentar a ADM e funcionalidade. Porém, o volume total dos protocolos de alongamento foi determinante para o incremento da ADM, isto é, as idosas que treinaram com volume maior 420s (Batista *et al.*, 2009) apresentaram ganho mais expressivo de ADM do que as idosas que realizaram 135s (CRISTIANSEN, 2008).

De acordo com Soucie *et al.* (2010) o processo de envelhecimento diminui a ADM, sendo que a dorsiflexão sofre redução de 16% nas idosas e 6% nos idosos, já a extensão de quadril reduz 11% nas idosas e 23% nos idosos, prejudicando a execução correta das fases da marcha. Desta forma, Zotz e colaboradores (2014), verificaram em revisão sistemática com metanálise que o exercício de alongamento muscular realizado em idosos de forma estática com supervisão, pelo menos 2 vezes por semana, demonstra efeitos positivos no ganho de ADM de flexão de quadril e dorsiflexores a partir de 4 semanas de protocolo.

As evidências para prescrição de exercícios de alongamento têm preconizado duração entre 30-60 segundos, para grandes grupos musculares, sendo que para ganhos de flexibilidade recomenda-se tempo total de 60s para cada grupamento alongado, 3-4 repetições (ACSM, 2011). O processo de envelhecimento leva ao declínio da mobilidade articular, o que pode influenciar na flexibilidade (ACSM, 2011; GALLON *et al.*, 2011). Além disso, a idade tem relação direta com a capacidade viscoelástica da unidade músculo-tendínea (GAJDOSIK *et al.*, 1999; HOLLAND *et al.*, 2002). Dessa forma, parece ser necessária maior duração do estímulo de alongamento para provocar aumento significativo na ADM em indivíduos idosos (ZOTZ *et al.*, 2014).

Ainda, deformações plásticas e elásticas podem ocorrer na MEC, quando submetido ao programa de alongamento (GAJDOSIK *et al.*, 2001; COUTINHO *et al.*, 2006) e nas fibras musculares (COUTINHO *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2004; PEVIANI *et al.*, 2007; WEPPLER e MAGNUSSON, 2010).

A mobilização é importante para reorganização da MEC, por promover alinhamento funcional das fibras colágenas, minimizando o surgimento de aderências no tecido cicatricial após lesão muscular, período de imobilização bem como decorrentes do processo de envelhecimento (JÓZSA *et al.*, 1988; WU *et al.*, 2011). Além disso, Stone e colaboradores (1988) sugerem que o exercício físico pode aumentar a tensão do tecido conjuntivo, bem como a massa muscular, tornando o músculo mais resistente. Portanto, estes são benefícios que o alongamento muscular pode causar no tecido conjuntivo e muscular.

### 2.4.1 Estudos Experimentais sobre o Exercício de Alongamento

Para estudo dos efeitos do exercício de alongamento no músculo, muitos autores optam por modelos experimentais (CAÇÃO-BENEDINI *et al.*, 2013; COUTINHO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2007; PEVIANI *et al.*, 2007; PEVIANI *et al.*, 2009; RENNÓ *et al.*, 2007), com o intuito de aprofundar as análises musculares para compreensão dos efeitos deste exercício no meio intra e extracelular (FIGURA 7).

Recentemente, foram analisados os efeitos agudos do exercício de alongamento, realizado 72h pós-lesão no músculo gastrocnêmio de ratos jovens, no qual, o alongamento foi realizado manualmente, por meio de 1 série com 4 repetições de dorsiflexão máxima mantida por 30 segundos, com intervalo de 30 segundos entre cada repetição, realizadas diariamente, durante cinco dias (MACEDO *et al.*, 2014). Estes autores verificaram que não houve aumento significativo no número de sarcômeros em série sugerindo que o protocolo de alongamento agudo não promove estímulo suficiente para incrementar o número de sarcômeros em série (MACEDO *et al.*, 2014).

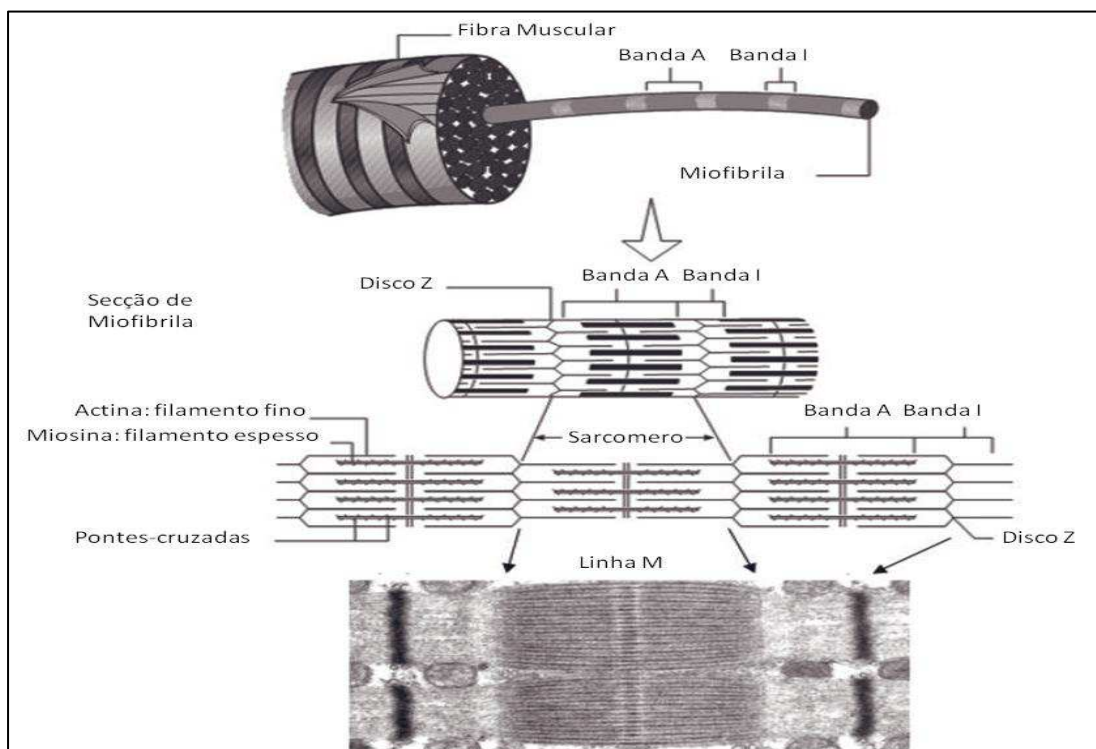


Figura 7 – Representação da fibra muscular mostrando a estrutura do sarcomero com os filamentos de actina e miosina. Adaptado de Cardinale, Newton e Nosaka (2011).

Em contrapartida, outros autores observaram que o exercício de alongamento realizado em ratos jovens, após lesão muscular, promoveu como efeito agudo a redução da fibrose tecidual, melhora significativa na regeneração e aumento da força muscular (HWANG *et al.*, 2006). Isto foi verificado em ratos submetidos ao protocolo de alongamento, constituído por 5 segundos de manutenção do estímulo de alongamento, com 5 segundos de intervalo e duração de 15 minutos (HWANG *et al.*, 2006). Desta forma, pode-se concluir que o volume de alongamento interfere diretamente na plasticidade muscular, já que a melhora no processo de regeneração e força musculares foi evidente apenas quando o protocolo de alongamento foi mantido por 15 minutos.

Williams e colaboradores (1988) avaliaram os efeitos do alongamento no músculo sóleo de ratos, imobilizado na posição de encurtamento, por um período de 10 dias, sendo que, a cada dois dias, a imobilização era removida e o músculo era alongado por um período de 15 minutos. Neste estudo foi encontrado que o alongamento passivo mantido, foi suficiente para manter a ADM da articulação bem como prevenir a proliferação de tecido conjuntivo. Coutinho *et. al* (2006) compararam 2 protocolos de alongamento, isto é, um realizado diariamente sendo 1 série de 10 repetições com duração de 60 segundos cada, e outro com alongamentos realizados três vezes por semana utilizando os mesmos parâmetros de prescrição, após imobilização na posição de encurtamento. Estes autores verificaram que a melhor reorganização do tecido conjuntivo foi encontrada nos músculos submetidos ao alongamento diário, demonstrando que a frequência do alongamento também interfere na adaptação do tecido conjuntivo muscular.

Além das alterações na MEC, a massa muscular também pode ser alterada quando o músculo esquelético é submetido a estímulo como o alongamento (GOLDSPINK *et. al*, 1992; YANG *et. al*, 1997). As alterações na massa muscular podem ser atribuídas às mudanças longitudinais, que ocorrem no número de sarcômeros em série, e/ou radiais (FIGURA 8), que acontecem na área de secção transversa das fibras musculares, as quais podem estar relacionadas com a relação síntese e degradação de proteínas (COUTINHO *et. al*, 2004; GOMES *et. al*, 2004; GOMES *et. al*, 2006; RENNÓ *et. al*, 2007; GOMES *et. al*, 2007).

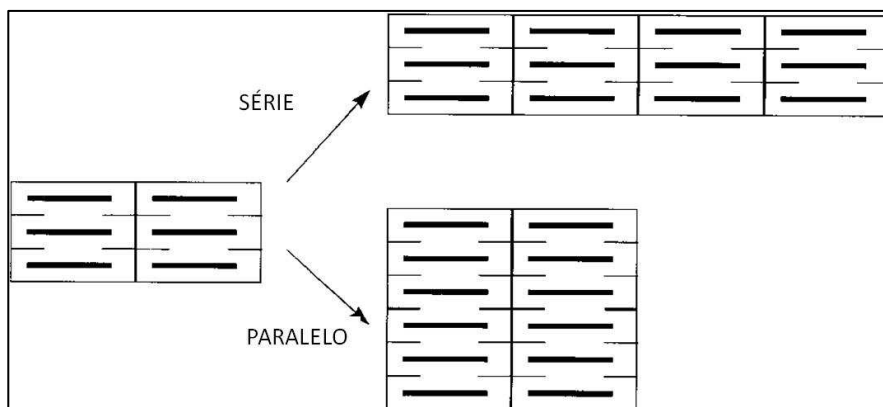


Figura 8: Representação da disposição dos sarcômeros no tecido muscular. Alterações na massa muscular, atribuídas a adição de sarcômeros. Adaptado de Russel, Motlag e Ashley (2000).

Assim, o aumento na massa muscular pode ser decorrente de aumento nas concentrações de RNA total (ácido ribonucléico) e na síntese de proteínas, decorrentes especialmente ao aumento do fator de crescimento relacionado à insulina (IGF-I) e de fatores regulatórios miogênicos (YANG *et. al*, 1997, GOLDSPINK *et. al*, 1999; PEVIANI *et. al*, 2007; GOMES *et. al*, 2006).

Trabalhos experimentais realizados nas décadas de 60-70 identificaram que o músculo aumentava seu comprimento através da adição de sarcômeros ao longo das fibras musculares (GAJDOSIK *et. al*, 2001, GOLDSPINK *et. al*, 1968; WILLIAMS e GOLDSPINK, 1971). Nesse período já era considerada a hipótese da adaptação das fibras musculares esqueléticas a diferentes graus de extensão, com provável remoção ou adição do número de sarcômeros em série, conforme a demanda funcional e o grau de extensão a que o músculo era submetido. Tabary e colaboradores (1972) observaram aumento de 20% no número de sarcômeros em série do músculo sóleo do gato, após 4 semanas de imobilização em posição de alongamento. Estudos posteriores mostraram que a imobilização dos músculos em posição alongada, acarretava em aumento no comprimento muscular pela adição no número de sarcômeros em série, particularmente nas duas regiões terminais das fibras musculares e prevenia a proliferação do tecido conjuntivo (WILLIAMS *et. al*, 1988; WILLIAMS *et. al*, 1990).

Estudos mais recentes mostraram que 40 minutos de alongamento passivo, realizado 2 ou 3 vezes por semana, foram suficientes para aumentar o número de sarcômeros em série e a área de secção transversa de fibras do músculo sóleo de

ratos (COUTINHO *et. al*, 2004; SECCHI *et. al*, 2008). No entanto, em músculos encurtados por imobilização, o alongamento preveniu a atrofia muscular (COUTINHO *et. al*, 2004). Já no estudo de Secchi e colaboradores (2008) o grupo que realizou apenas exercício resistido, 3 vezes por semana, também apresentou aumento da área de secção transversa das fibras do sóleo, sugerindo hipertrofia muscular. No entanto, o grupo que realizou ambos os treinamentos (alongamento 2x/semana e exercício resistido 3x/semana) apresentou diminuição no comprimento muscular e no número de sarcômeros em série, provavelmente devido à frequência diária de treinamento, impossibilitando a recuperação muscular ideal entre os estímulos, a qual ocorre entre 36 a 48 horas, período de pico de síntese protéica após o exercício (KRAEMER *et. al*, 2002; HAAS *et. al*, 2001).

Em outro estudo, quando se diminuiu o tempo de alongamento para apenas 10 minutos no sóleo de ratos jovens imobilizados, realizado de forma intermitente (10 repetições com duração de 1 minuto cada), diariamente, foi observada reorganização do colágeno e hipertrofia muscular (COUTINHO *et. al*, 2006). Já o grupo de ratos imobilizados e alongados três vezes por semana, com o protocolo de 10 repetições, com manutenção de 1 minuto e intervalo de 30 segundos entre cada repetição, apresentaram recuperação da área de secção transversa do sóleo quando comparado com a pata contralateral (COUTINHO *et al.*, 2006).

Além da adaptação do número de sarcômeros em série, para que o músculo desenvolva a máxima tensão, ocorre adaptação no comprimento do sarcômero. Desta forma, na década de 60 foram identificadas as bases morfo-funcionais da relação comprimento-tensão da fibra muscular, através de um experimento cuidadoso e sofisticado realizado por Gordon e colaboradores (1966), no qual identificaram em sarcômeros isolados, que a força isométrica máxima é produzida quando o sarcômero atinge um comprimento próximo ao comprimento da sua posição em repouso, isto é, entre 2-2.25 $\mu$ m. Essa força diminui quando os sarcômeros são alongados ou encurtados.

Nesse estudo foi demonstrado que a força isométrica dos sarcômeros atinge seus níveis máximos quando há uma sobreposição ótima entre os filamentos de actina e miosina, o que ocorre quando o comprimento do sarcômero está entre 2.0-2.25  $\mu$ m. Este estudo permitiu identificar que a força gerada pela contração muscular

depende da quantidade de pontes cruzadas (“ligações”) entre os filamentos de actina e miosina no interior dos sarcômeros (GORDON *et. al*, 1966).

Considerando que os filamentos de actina e miosina têm comprimento constante, a adaptação dos músculos adultos a diferentes comprimentos funcionais se dá removendo ou adicionando sarcômeros em série, com o objetivo de manter o comprimento fisiológico e funcional dos sarcômeros na fibra muscular (WILLIAMS *et. al*, 1988).

Coutinho e colaboradores (2004) mostraram que sessões de alongamento passivo aplicado três vezes por semana durante 40 minutos por 3 semanas no sóleo imobilizado e encurtado de ratos, não é suficiente para evitar a perda de série sarcômeros, mas é suficiente para prevenir atrofia das fibras musculares. Além disso, nos músculos não imobilizados que receberam 3 sessões de alongamento por semana, verificou-se um aumento tanto no número de sarcômeros em série como na área de secção transversa das fibras musculares. Estes resultados indicam um benefício importante do alongamento aplicado a cada três dias em músculo esquelético e demonstraram que o protocolo de alongamento utilizado foi eficaz para sarcomerogênese.

Já Cação-Benedini e colaboradores (2013) verificaram aumento do comprimento muscular do sóleo e número de sarcômeros em séries de ratas jovens imobilizadas submetidas a protocolo de alongamento constituído de 10 repetições com 30 segundos de manutenção do estímulo e 30 segundos de intervalo entre cada repetição, o protocolo foi realizado diariamente durante 3 dias. Estes achados mostram que dependendo da intensidade, frequência, volume de alongamento aplicado, sexo e idade dos animais, é possível ocorrer sarcomerogênese mesmo em um protocolo agudo.

As adaptações morfológicas nas fibras musculares (COUTINHO *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2004) e no tecido conjuntivo (COUTINHO *et al.*, 2006) parecem ter relação com a intensidade, duração e frequência do alongamento, descritos em ratos jovens. Essas respostas adaptativas influenciam a flexibilidade e a geração de força muscular (GAJDOSIK *et al.*, 2005).



Kamikawa e colaboradores (2013) avaliaram 2 grupos de camudongos, onde, um grupo realizou alongamento repetitivo, com 15 repetições por minuto, com duração de 15 minutos, realizado diariamente no músculo gastrocnêmio direito, durante uma semana. E, o outro grupo, realizou o mesmo protocolo 4 vezes por semana, durante uma semana. Neste estudo, verificou-se que o exercício de alongamento repetitivo, afeta continuamente a mudança da conformação da matriz extracelular, e o exercício de alongamento contínuo, afeta o estímulo mecânico da MEC em uma única vez. Dessa forma, verificaram que o alongamento repetitivo foi mais eficaz do que alongamento contínuo, pois funciona de maneira cumulativa. Apesar das diferenças apontadas entre o alongamento passivo repetitivo e contínuo, os autores afirmam que o exercício de alongamento passivo, independente do protocolo realizado, é útil para a prevenção e manutenção do trofismo muscular (KAMIKAWA et al., 2013).

Apesar dos estudos com animais elucidarem algumas respostas adaptativas do tecido muscular a determinados protocolos de alongamento (TABELA 1), ainda não existe consenso na literatura sobre os parâmetros de prescrição de exercício de alongamento e seus efeitos morfológicos na população idosa.

**Tabela 1. Estudos com protocolos de alongamento em ratos e seus desfechos**

AUTORES	PROTOCOLOS DE ALONGAMENTO	ANIMAL	DESFECHOS
<b>CAÇÃO-BENEDINI et al (2013)</b>	1 série; 10 repetições; 30 segundos de manutenção; 30 segundos de intervalo; 3x/semana; Duração: 3 dias	Ratas Jovens	Aumento do comprimento muscular do sóleo e nº de sarcômeros em série.
<b>COUTINHO et al. (2004)</b>	1 série; 1 repetição; 40 minutos; 3x/semana; Duração: 3 semanas	Ratos Jovens	Aumento no nº de sarcômeros em série e ASTFM.
<b>COUTINHO et al. (2006)</b>	1 série; 10 repetições; 60 segundos de manutenção; 30 segundos de intervalo; Duração: 3 semanas	Ratos Jovens	Reorganização do colágeno; Hipertrofia muscular

<b>GOMES et al. (2004)</b>	1 série; 1 repetição; 40 minutos; 1x/semana; Duração:3 semanas	Ratos Jovens	Amenizou atrofia muscular
<b>HWANG et al (2006)</b>	1 série; 180 reetições; 5 segundos de manutenção; 5 segundos de intervalos;Duração: 1 semana	Ratos Jovens	Redução da fibrose tecidual; Aumento da força muscular
<b>MACEDO et al (2014)</b>	1 série; 4 repetições; 30 segundos de manutenção; 30 segundos de intervalo; 5x/semana; Duração:1 semana	Ratos Jovens	Não houve aumento no nº de sarcômeros em série
<b>WILLIAMS et al. (1990)</b>	1 série; 1 repetição; 30 minutos de manutenção; Duração:3 semanas	Ratos Jovens	Prevenção da perda de sarcômeros em série, da atrofia muscular e proliferação de tecido conjuntivo.

#### 2.4.2 Modelos Animais de Envelhecimento para estudo dos efeitos do exercício de alongamento

De acordo com o ACSM (2011), poucos estudos foram realizados com o intuito de investigar os efeitos dos exercícios de alongamento no músculo idoso, sendo que a maioria desses estudos apresenta nível C em evidência, isto é, as evidências são provenientes de ensaios clínicos não randomizados e não controlados, ou de estudos observacionais. Dessa forma, a realização de estudos experimentais controlados e randomizados poderia auxiliar no aumento de evidências científicas para a prescrição de exercícios de alongamento para idosos.

Para estudar os efeitos do exercício de alongamento no músculo envelhecido, muitas vezes são utilizados modelos animais que mimetizem tal processo. Alguns estudos optam pela privação do estrogênio em ratas jovens, por meio da ovariectomia, o que mimetiza o envelhecimento (McCLUNG *et.al*, 2006; MORAN, WARREN e LOWE, 2006). O hipoestrogenismo prolongado pode provocar um processo de perda de densidade no interior da fibra muscular, diminuindo seu sarcoplasma, o que seria responsável pela perda de espessura e da força do músculo esquelético, quadro conhecido como sarcopenia (TIIDUS *et. al*, 2001).

Com relação ao tecido muscular, ocorrem mudanças nas propriedades contráteis devido a capacidade reduzida de sintetizar novas proteínas e o desequilíbrio entre síntese e degradação das proteínas musculares, aumento da MEC e de gordura intramuscular, diminuição da área de secção transversa das fibras musculares e diminuição do número de receptores de estrôgeno no músculo esquelético (KADI *et. al*, 2002; MALTAIS *et. al*, 2009).

A remoção do hormônio ovariano de camundongos fêmeas, via ovariectomia, foi prejudicial para a função contrátil do músculo sóleo (MORAN, WARREN e LOWE, 2006). Neste mesmo estudo os autores observaram que a ovariectomia induz disfunção muscular contrátil e que as concentrações circulantes de estradiol estão correlacionadas com a geração de força muscular e função da miosina, demonstrando que o estradiol afeta o músculo esquelético.

McClung e colaboradores (2006) mostraram que a ovariectomia compromete a recuperação da atrofia por desuso na área de secção transversa das fibras musculares do sóleo, durante 2 semanas de deambulação normal em gaiola, enquanto a reposição com estrôgeno permitiu a restauração do tamanho da fibra muscular.

Prestes e colaboradores (2008), observaram a diminuição da atividade das MMP-2 no músculo de ratas ovariectomizadas. As MMPs são essenciais para a manutenção do tecido saudável, sendo que a subclasse das MMP-2 exerce um papel na proliferação e diferenciação miofibrilar, recuperação após dano e homeostasia do tecido conjuntivo local (JAWORSKI *et. al*, 2005). Assim, estes autores sugerem que a fraqueza e disfunção muscular induzida pela ovariectomia estão relacionadas a diminuição da atividade das MMP-2, afetando a remodelação do músculo esquelético.

A mimetização do processo de envelhecimento pela ovariectomia é comum nos estudos experimentais (PRESTES *et al.*, 2008; MORAN, WARREN e LOWE, 2006). Porém, para que a extrapolação dos resultados de estudos experimentais fosse realizada para a população humana, seria importante considerar a relação da idade dos animais com a idade dos humanos, a fim de refinar os resultados para a população foco do estudo. Desta forma, foi realizado estudo de revisão sistemática

comparando a idade dos ratos com a idade correspondente para humanos (TABELA 2).

Tabela 2: Idade de ratos em meses relacionada com a idade de humanos em anos (Andreollo *et al*, 2012).

<b>Idade dos Ratos em Meses</b>	<b>Idade dos humanos em anos</b>
6 meses	18 anos
12 meses	30 anos
18 meses	45 anos
24 meses	60 anos
30 meses	75 anos
36 meses	90 anos
42 meses	105 anos
45 meses	113 anos
48 meses	120 anos

Kodama e colaboradores (2012) consideraram para condução de estudo em ratos idosos a idade de 15 meses. Apesar dos estudos apresentados envolverem a investigação dos efeitos do exercício no tecido muscular, não há literatura que tenha investigado as adaptações morfológicas e moleculares do alongamento no músculo de rata idosa. Dessa forma, a presente tese objetivou pesquisar o comportamento morfológico e molecular do músculo esquelético de rata idosa mediante estímulo de alongamento muscular.



## **2.5 OBJETIVOS**

### **2.5.1 Objetivo Geral**

Desenvolver aparato de alongamento e avaliar os efeitos agudos do alongamento mecânico passivo estático, na morfologia, concentrações de colágenos e TGF $\beta$ -1 e expressão gênica do TGF $\beta$ -1 no músculo sóleo de ratas idosas.

### **2.5.2 Objetivos Específicos**

- Desenvolver aparato de alongamento;
- Avaliar a massa corporal e a massa do músculo sóleo das ratas;
- Medir o comprimento final do músculo sóleo esquerdo;
- Mensurar a área de secção transversa das fibras musculares do sóleo esquerdo;
- Contar o número e estimar o comprimento dos sarcômeros;
- Quantificar os colágenos tipo I, III e TGF $\beta$ -1;
- Analisar a expressão gênica do TGF $\beta$  -1.

## **2.6 HIPÓTESES**

H0) O alongamento muscular agudo não interfere na morfologia, porcentagem de colágeno I e III e TGF $\beta$  -1, e expressão gênica de TGF $\beta$  -1 nas fibras musculares de ratas idosas;

H1) O aparato é eficaz para alongar mecanicamente o músculo sóleo de rata.

H2) O exercício de alongamento muscular agudo aumenta o número sarcômeros em série em músculos de ratas idosas.

H3) O exercício de alongamento muscular agudo aumenta a área de secção transversa nos músculos de ratas idosas.

H4) O exercício de alongamento muscular diminui a porcentagem de colágeno I e TGF $\beta$  -1 nas fibras musculares de ratas idosas por análise imunohistoquímica;

H5) O exercício de alongamento muscular aumenta a porcentagem de colágeno III nas fibras musculares de ratas idosas por análise imunohistoquímica;

H6) O exercício de alongamento muscular agudo diminui a expressão gênica do TGF $\beta$ 1 nas fibras musculares de ratas idosas;





## **MATERIAIS E MÉTODO**

Foi realizado estudo do tipo experimental, randomizado, controlado, cego e de caráter transversal. Esta pesquisa foi submetida à apreciação do CEUA (Comitê de Ética em Utilização Animal) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, obtendo aprovação com número do parecer 732/12 (ANEXO I). A manutenção dos animais (de 3, 15 e 26 meses) foi desenvolvida no Biotério Central da PUCPR e o alongamento do músculo sóleo das ratas foi realizado no laboratório de cultivo celular da PUCPR.

O processamento do material biológico foi realizado nos laboratórios multiusuários do Setor de Ciências Biológicas da UFPR dos seguintes departamentos: Zoologia, Bioquímica, Fisiologia e Biologia Celular, no laboratório de plasticidade muscular do Departamento de Fisioterapia da UFSCar e no laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

O estudo foi dividido em quatro etapas, conforme esquema abaixo (FIGURA 9).

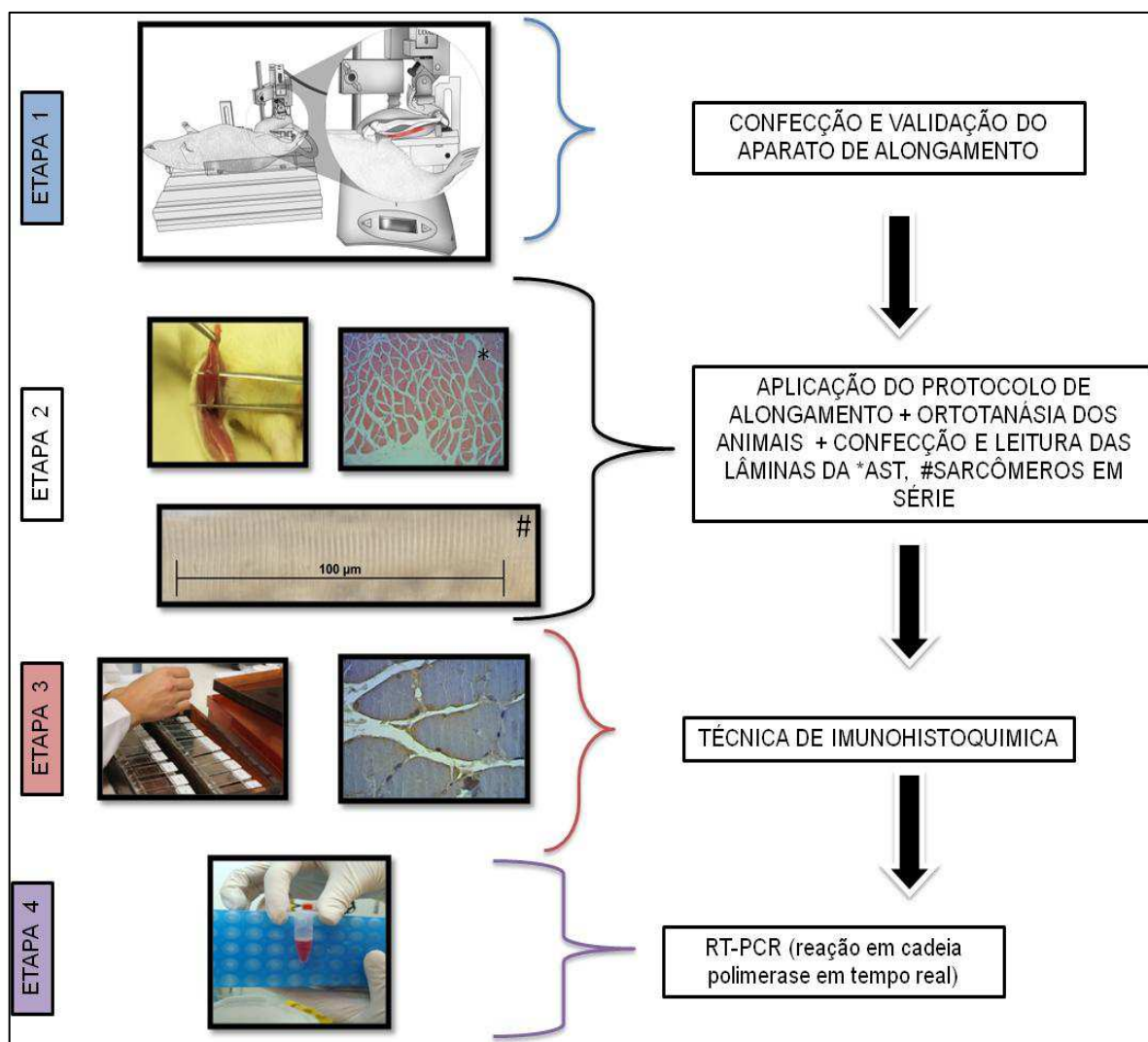


Figura 9. Etapas do Estudo. AST – área de secção transversa; \* lâmina de AST; # lâmina de sarcômeros em série.

Dessa forma, materiais e método, resultados e discussão de cada etapa, serão apresentados separadamente.



## ESTUDO PILOTO

Após aprovação pelo CEUA, foi realizado estudo piloto que teve o seguinte objetivo:

- Desenvolver o aparato de alongamento muscular;
- Padronizar a técnica de alongamento no aparato;
- Validar o aparato de alongamento.

Para tal procedimento foram utilizados 12 *Rattus norvegicus*, fêmeas, da variedade Wistar albino, sendo divididos em dois grupos:

- Ratas Jovens (com 3 meses de vida);
- Ratas Idosas (com 15 meses de vida) (KODAMA *et al.*, 2012).

Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e ração peletizada, no biotério da PUCPR. O estudo foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

### 3.1.1 Anestesia

Antes dos procedimentos piloto aqui descritos, todos os animais foram pesados e posteriormente anestesiados com injeção intramuscular de 80mg/kg de ketamina e 8mg/kg de xilasina, recebendo dose de reforço se necessário.

### 3.1.2 Aparato de Alongamento

Foi desenvolvido um aparato de alongamento para o músculo sóleo, com o intuito de mensurar a força aplicada para promover a deformação músculo-tendínea necessária durante o exercício de alongamento passivo estático. Para tanto, o aparato (Figura 10 A) compreendeu uma base em alumínio que permitia a mobilidade para ajustar o corpo dos ratos de acordo com seu tamanho, por meio de adequação das hastes (3) e suportes de fixação (2) do animal em relação à base (1) e ao suporte cilíndrico.

As placas (5) e (6) fazem a fixação mecânica das articulações do quadril e joelho, dessa forma, o músculo sóleo foi isolado para o alongamento. Além disso, a articulação talo-crural também foi mecanicamente fixada em posição neutra ( $90^\circ$ ), sendo assim, o alongamento foi gerado usando a força da mola (9) contra a guia para haste de medição (10) o que fez com que o estabilizador (13) produzisse força na vertical de cima para baixo, tal força era registrada na célula de carga (16). A figura 10B compreende as dimensões do aparato.

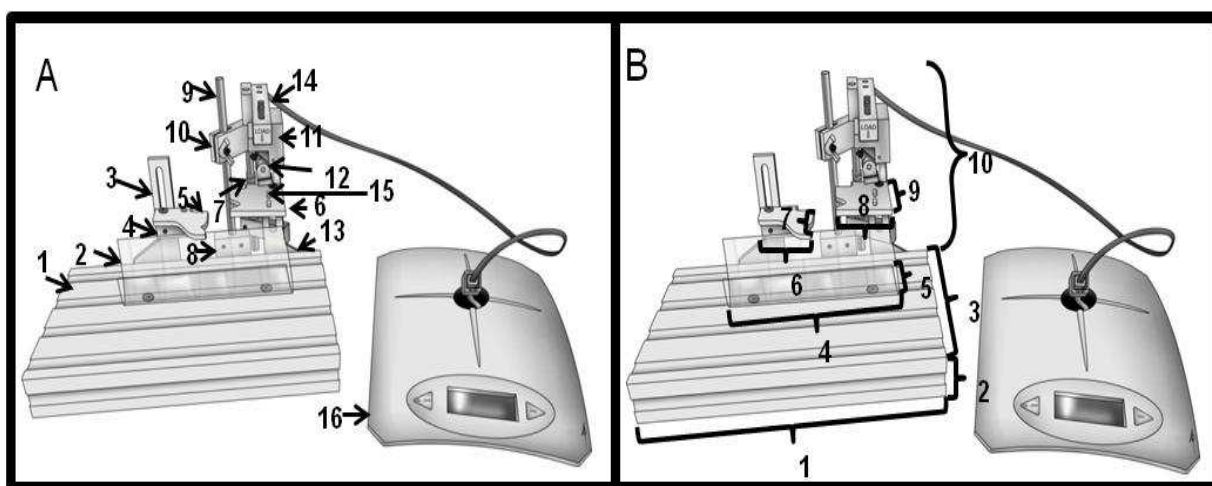


Figura 10. Descritivo do Aparato de Alongamento. A: 1-base de alumínio; 2- suporte para o corpo do animal; 3- barra com ajuste horizontal e vertical; 4- peça para ajuste do ângulo da articulação do quadril; 5- base para suporte da coxa; 6- base para suporte da perna; 7- mola que permite movimentar a peça que pressiona a região plantar do membro posterior esquerdo durante o alongamento.; 8- base com ajuste horizontal para fixar a barra que suporta a parte ajustável para movimentar a peça que contém a célula de carga; 9- barra cilíndrica com ajuste vertical da peça que movimenta a célula de carga; 10- peça que movimenta a célula de carga verticalmente; 11- suporte para a célula de carga; 12- eixo para ajuste da posição da perna; 13- peça para regulação vertical do sistema da célula de carga; 14- célula de carga em pêndulo. 15 – faixa que fixa a articulação talo-crural; 16. Leitor da célula de carga. B. Dimensões do aparato. 1- 23,4cm; 2- 3 cm; 3- 12cm; 4- 13,5cm; 5- 3,5cm; 6- 3,3 cm; 7- 3,3cm; 8- 4,2cm; 9- 4cm; 10- 13cm.

Já a figura 11 demonstra o animal em decúbito dorsal no aparato, com o membro posterior esquerdo posicionado para o alongamento muscular, e a figura 12, demonstra o aparato com o animal.

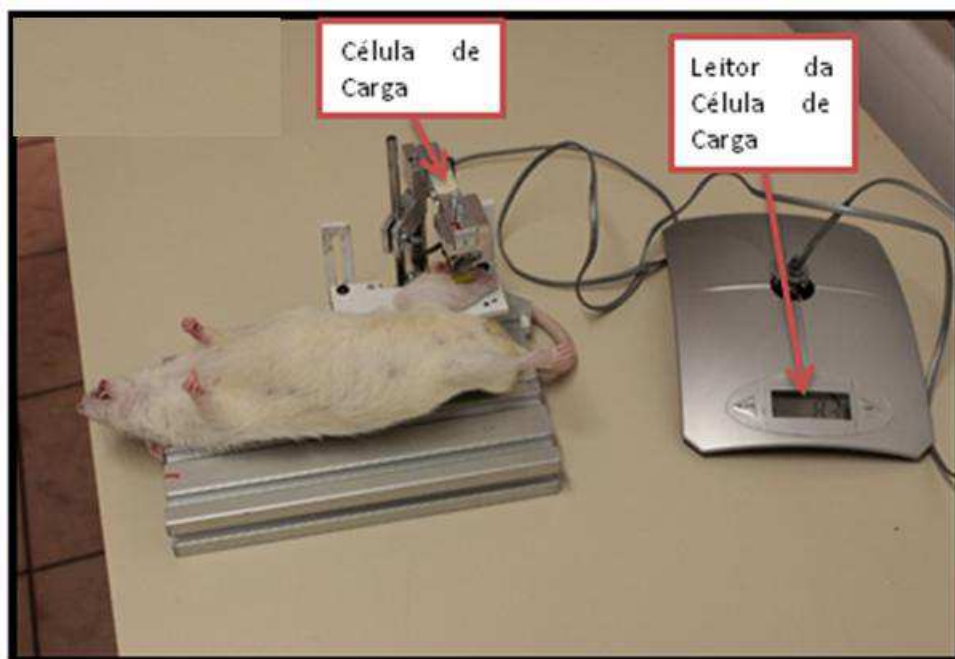


Figura 11. Animal em decúbito dorsal, com o membro posterior esquerdo posicionado para o alongamento muscular.

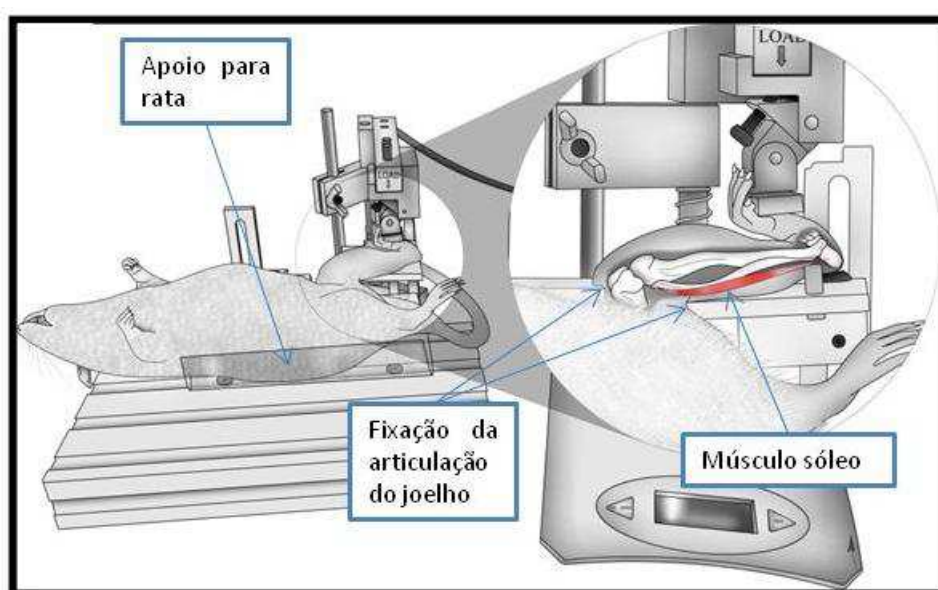


Figura 12. Desenho esquemático apresentando detalhes da posição do joelho e músculo sóleo durante o alongamento

### 3.1.2.1 Calibração da Célula de Carga

De acordo com Doebelin (2004) sistema de medição de boa qualidade deve ser capaz de operar com pequenos erros. Entretanto, por melhores que sejam as características do sistema de medição, este sempre apresentará erros, seja por fatores internos, seja por ação das grandezas de influência externa. A perfeita caracterização das incertezas associadas a estes erros é de grande importância para que o resultado da medição possa ser estimado de forma segura. Embora em alguns casos, os erros de um sistema de medição possam ser analítica ou numericamente estimados, na prática são utilizados procedimentos experimentais para verificar a fidedignidade da leitura do sistema de medição. A estes procedimentos, dá-se o nome de calibração, na qual é possível correlacionar os valores indicados pelo sistema de medição e sua correspondência com a grandeza sendo medida (DOEBELIN, 2004).

No caso do aparato de alongamento, a célula de carga faz a leitura em gramas, sendo que o valor máximo da leitura é de 1.090 gramas, dessa forma, para o procedimento de calibração da célula de carga foram utilizadas massas cuja grandeza era conhecida. Primeiramente as massas foram aferidas sete vezes em balança de precisão certificada (*Marte* – modelo AW220) (Figura 13A), esses valores foram anotados e realizado cálculo da média, para verificar a fidedignidade da leitura da célula de carga do aparato. Em seguida, devido ao fato da célula de carga estar em pêndulo, foi colocado um recipiente pendurado nesta, de modo que as massas pudessem ser apoiadas (FIGURA 13B), além disso, o aparato foi fixado na bancada para garantir sua estabilidade durante a aferição. Posteriormente, foi colocada uma massa por vez no recipiente e anotado o valor de leitura da célula de carga, até que todas as massas fossem incluídas no recipiente, a partir disso, estas foram retiradas, uma por vez, da última para a primeira e, também foram anotados os valores de leitura da célula de carga, o procedimento foi repetido cinco vezes (DOEBELIN, 2004).

Esta calibração foi realizada no setor de meio de cultura e reativos do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), sob orientação do Professor Irionsson Bassani (PUCPR).



Figura 13. Protocolo de calibração do aparato de alongamento. A- aferição das massas em balança de precisão; B- Aferição da célula de carga do aparato.

### 3.1.3 Protocolo de Alongamento Piloto e Leitura da Célula de Carga

Para efetuar o alongamento passivo no músculo sóleo esquerdo, o animal foi previamente pesado em balança (*Mettler/Toledo*) com capacidade de 25g a 3 Kg, e em seguida anestesiado e posicionado no aparato de alongamento com a articulação talo-crural em flexão dorsal máxima para alongamento do músculo sóleo (PEVIANI *et al*, 2007). O protocolo de alongamento consistiu em uma série de 10 repetições de 1 minuto com intervalo de 45 segundos entre cada repetição, controlado através de um cronômetro (*Technos*) (adaptado de PEVIANI *et al.*, 2007, STAUBER *et al.*, 2002), o alongamento foi realizado no músculo sóleo esquerdo, 2 vezes por semana (segunda e quinta-feira) durante uma semana, sempre no mesmo horário do dia, isto é, no período da manhã.

Os dados referentes à leitura da célula de carga foram registrados ao início e final de cada repetição do exercício de alongamento, a fim de verificar a adaptação músculo-tendínea durante o exercício. Para tanto, foram utilizados 6 ratas wistar albino, com 3 meses de idade e 6 ratas Wistar albino, com 15 meses de idade. A célula de carga expressava os valores de leitura em gramas, dessa forma, os dados foram tabulados em planilha *Excel* e convertidos em kilograma-força (kgf).

A fim de verificar a confiabilidade das medidas, foi realizado o cálculo do ICC (*intraclass correlation coefficient*), comparando a análise intraavaliador, entre os dois



dias de coleta, sendo que as variáveis analisadas foram os dados referentes à leitura da célula de carga, ao início e final de cada repetição do exercício de alongamento.

Para verificar a linearidade da medida da célula de carga, os valores foram transformados utilizando função logarítmica  $\log(x + 1)$  e então realizada análise de regressão de linearidade pelo *software R*, com assistência técnica da Profa Dra Ana Tereza Bittencourt Guimarães (UNIOESTE).

### 3.1.3.2 Fotometria

Para avaliar o ângulo formado na articulação tíbio-társica durante o alongamento, foi realizada a fotometria. Para tanto, os animais foram posicionados no aparato de alongamento descrito anteriormente, que estava alocado em uma bancada com distância aparato-chão de 1,06 metros de altura. Em seguida foram realizadas fotografias com câmera digital (Canon EOS rebel 600D, e lente da marca Canon macro *lens* EF 100mm 1:2.8L IS USM) posicionada em tripé com 1,07 metros de altura, perpendicularmente ao plano sagital do animal (CARREGARO *et al.*, 2007), a uma distância focal de 80 centímetros, com o foco apontado para a tíbia (FIGURA 14A) (CODARIN *et al.*, 2012). A captação das imagens foi realizada com flash e resolução de 18 megapixels.

Para garantir que a região calcânea ficasse em contato com a superfície de apoio do aparato de alongamento, foi inserido um cordão elástico com trava por pressão (FIGURA 10A item 15). Os marcadores utilizados foram obtidos a partir de adesivos refletivos para capacete de motocicleta, os quais são vigentes pela legislação brasileira, sendo estes recortados com *punch* descartável da marca Kolpacir®, o qual possui 4mm de diâmetro, deixando todos os marcadores com diâmetro padronizado. Os animais foram previamente tricotomizados para facilitar a fixação do marcador à pele, sendo que, somente a perna esquerda passou pelos procedimentos de preparo e aquisição de imagem.

Conjunto de três marcadores (diâmetro = 4mm) foi posicionado nos seguintes pontos anatômicos: tíbia, calcâneo e primeiro metatarso (FIGURA 14B e 14C). O ângulo foi formado pelas retas dos segmentos: tíbia-calcâneo e calcâneo- primeiro metatarso (CODARIN *et al.*, 2012). O ângulo foi quantificado a partir do sistema de

coordenadas obtidas das fotografias pelo programa *Image J*. Foram realizadas três fotografias para a posição de relaxamento e alongamento no aparato (FIGURA 14D), para cada animal. Dessa forma, foram coletadas 6 imagens por animal, totalizando 72 imagens para análise.

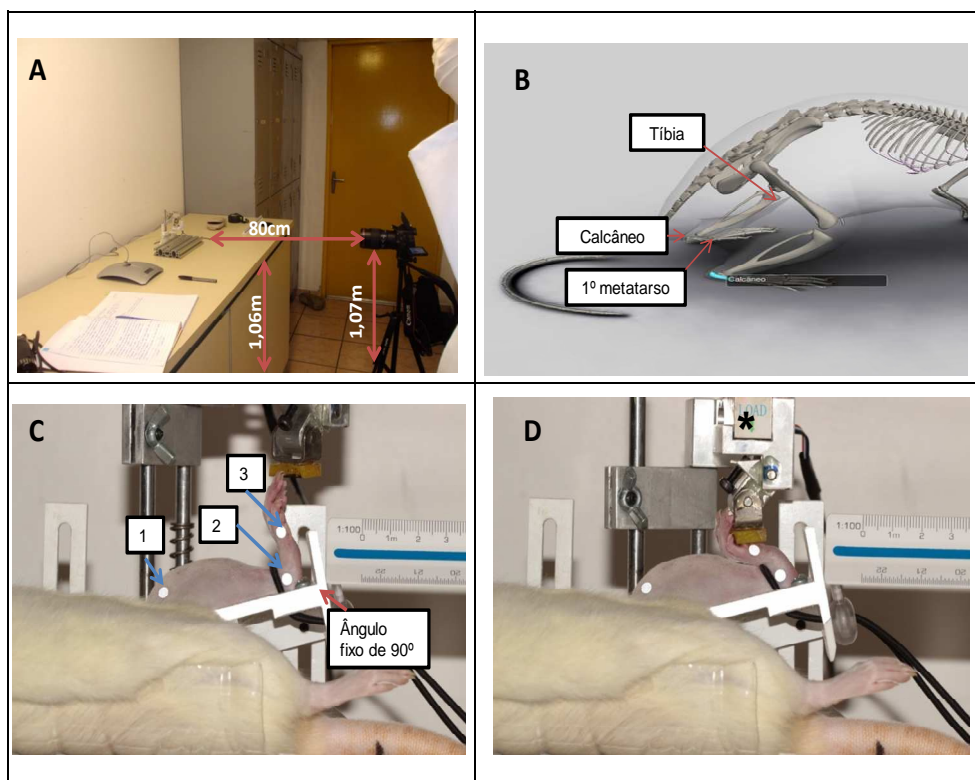


Figura 14. Fotometria. A: disposição dos equipamentos para aquisição das imagens; B: pontos anatômicos selecionados; C: posicionamento dos marcadores nos pontos anatômicos (1-côndilo medial; 2-maléolo medial; 3-cabeça do 1º osso do metatarso), ângulo fixo de 90° da articulação talo-crural; D: aquisição da imagem durante o alongamento. \* célula de carga utilizada para mensurar a força aplicada para promover o alongamento do músculo sóleo.

### 3.1.4 Análise Estatística

Os dados relacionados ao peso corporal, calibração da célula de carga, força e ângulo da articulação talo-crural foram analisados. O teste t – pareado foi utilizado na comparação entre as massas corporais inicial e final em cada grupo. A análise de normalidade dos dados foi realizada com o teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo teste Levene. Quando os resultados tiveram distribuição normal e homogênea o

teste ANOVA e *post hoc Tuckey* foi realizado. E, no caso dos dados que não apresentaram distribuição normal e homogênea foi realizado o teste Kruskal-Wallis. Os valores foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ , para todas as comparações. Estas análises foram realizadas pelo software *Statistic, version 7.0®*, USA.

Para tanto as variáveis consideradas dependentes foram: massa corporal inicial e final; força (N) aplicada para promover alongamento no grupo de ratas idosas; ângulo da articulação talo-crural no grupo de ratas idosas.

O ICC (*intraclass correlation coefficient*) foi analisado com o software *SPSS*, version 20. E, o erro de medida (*Standard Error of Measurement- SEM*) foi calculado utilizando a seguinte equação: desvio padrão multiplicado por  $\sqrt{(1-ICC)}$ . E, a avaliação da linearidade foi realizada pelo software *R*, para verificar a confiabilidade da calibração da célula de carga.



## 4.1 APARATO DE ALONGAMENTO

### 4.1.1 Massa Corporal

Na análise da massa corporal, não houve diferença significativa na comparação intragrupos. Entretanto, quando realizada a comparação entre grupo de ratas jovens e idosas foi encontrada diferença significativa na avaliação da massa corporal inicial intergrupos ( $311,3 \pm 11,3\text{g}$  vs  $351 \pm 43,2\text{g}$ ,  $p=0,02$ , Tabela 4) e, massa corporal final ( $315,3 \pm 9,2\text{g}$  vs  $351 \pm 43,2\text{g}$ ,  $p=0,005$ ). O grupo de ratas idosas não apresentou diferença significativa entre peso final e inicial ( $352,3 \pm 42,4\text{g}$  vs  $351 \pm 43,2\text{g}$ ,  $p=0,36$ ).

Tabela 3. Massa Corporal e Idade dos Grupos.

	<b>Idade</b>	<b>Inicial</b>	<b>Final</b>
	<b>(meses)</b>	<b>Massa Corporal (g)</b>	<b>Massa Corporal (g)</b>
<b>Ratas Jovens</b>	$3 \pm 0$	$311 \pm 11,3$	$315,3 \pm 9,2$
<b>Ratas Idosas</b>	$15 \pm 0$	$351 \pm 43,2^*$	$352,3 \pm 42,4^{\S}$

Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. \* quando comparado com o peso inicial intergrupos ( $p=0.02$ , teste T pareado);  $\S$  quando comparado com o peso final intergrupos  $p=0,005^{\S}$  (teste T pareado).

### 4.1.2 Calibração da Célula de Carga

Os dados referentes a calibração da célula de carga apresentaram confiabilidade excelente, confirmado pelo ICC 0,934, e pelo erro de medida 0,003. Além disso, os valores de leitura da célula de carga apresentaram linearidade na maioria das medidas ( $R^2=0,9819$ ) (Figura 27).

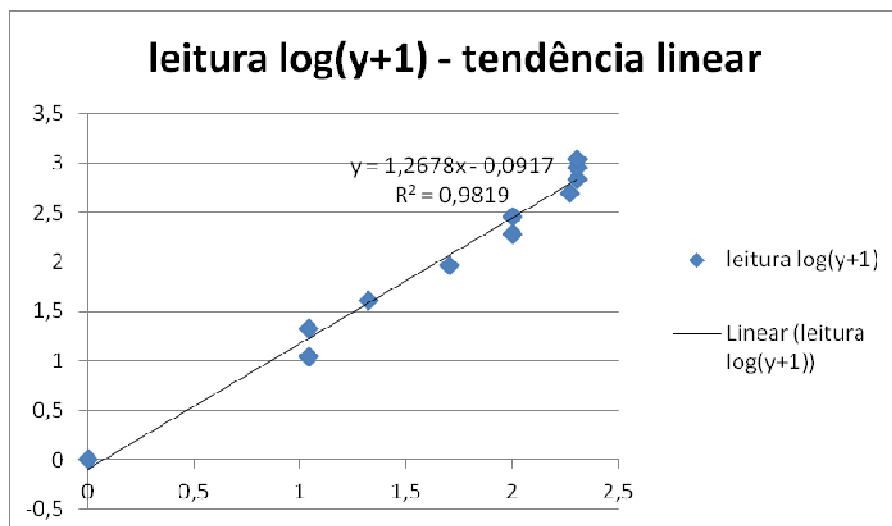


Figura 15. Linearidade das medidas da célula de carga.

Os valores referentes a leitura da célula de carga (g), bem como a força registrada em Newton, são apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Dados referentes a Leitura da Célula de Carga e Força registrada (N)

Massa (g)	Leitura da Célula de Carga (g)	Força registrada (N)
0	0	0
9,99	10	0,09±0,00
20,04	20	0,19±0,00
40,07	40	0,39±0,00
90,05	90	0,88±0,00
190,07	190	1,86±0,00
290,14	290	2,84±0,00
475,9	490	4,66±0,00
676,0	690	6,63±0,00
875,9	890	8,59±0,00
1075,9	1090	10,5±0,00

Resultados descritos em média±desvio-padrão

#### 4.1.3 Força (N) para promover o alongamento do músculo sóleo

Na comparação da força (N) aplicada para promover o alongamento do músculo sóleo, dentro do grupo de ratas jovens e do grupo de ratas idosas não

houve diferença (Tabela 6). Entretanto, ao comparar os valores de força (N) para realizar o alongamento, foi verificada diferença significativa intergrupos, na qual, o grupo de ratas idosas apresentou menor força (N) quando comparada as ratas jovens (Tabela 6). Entretanto, não houve diferença significativa na força aplicada para promover o alongamento na terceira ( $p=0,064$ , *Kruskal-Wallis*) e oitava repetição ( $p=0,126$ , *Kruskal - Wallis*), intergrupos (Tabela 6).

Tabela 5. Força (N) aplicada para promover o alongamento do músculo sóleo.

Repetição		Ratas Jovens	Ratas Idosas	p
1 <sup>a</sup>	Inicial	0,64±0,05	0,5±0,06	0,001*
	Final	0,53±0,05	0,41±0,04	0,001 <sup>§</sup>
2 <sup>a</sup>	Inicial	0,65±0,04	0,48±0,05	0,001*
	Final	0,55±0,06	0,39±0,05	0,001 <sup>§</sup>
3 <sup>a</sup>	Inicial	0,65±0,05	0,51±0,01	0,000*
	Final	0,54±0,08	0,41±0,02	0,064
4 <sup>a</sup>	Inicial	0,66±0,04	0,46±0,03	0,008*
	Final	0,56±0,05	0,38±0,03	0,008 <sup>§</sup>
5 <sup>a</sup>	Inicial	0,64±0,06	0,49±0,03	0,000*
	Final	0,50±0,03	0,41±0,03	0,001 <sup>§</sup>
6 <sup>a</sup>	Inicial	0,64±0,03	0,48±0,03	0,000*
	Final	0,52±0,03	0,39±0,04	0,000 <sup>§</sup>
7 <sup>a</sup>	Inicial	0,63±0,03	0,48±0,03	0,001*
	Final	0,61±0,03	0,40±0,04	0,001 <sup>§</sup>
8 <sup>a</sup>	Inicial	0,66±0,05	0,46±0,03	0,014*
	Final	0,55±0,07	0,39±0,04	0,126
9 <sup>a</sup>	Inicial	0,61±0,04	0,47±0,03	0,000*
	Final	0,52±0,04	0,38±0,04	0,000 <sup>§</sup>
10 <sup>a</sup>	Inicial	0,63±0,02	0,48±0,03	0,000*
	Final	0,54±0,03	0,40±0,04	0,000 <sup>§</sup>

Os resultados estão descritos como média ± desvio-padrão. \* quando a força inicial para promover o alongamento foi comparada intergrupos (Kruskal-Wallis); <sup>§</sup> quando a força final para promover o alongamento foi comparada intergrupos (Kruskal-Wallis).

#### 4.1.4 Ângulo da articulação Talo-Crural (fotometria)

Os ângulos da articulação talo-crural antes e durante o alongamento muscular não apresentaram distribuição homogênea nos dois grupos. Em relação ao ângulo estabelecido como posição neutra, não houve diferença significativa na comparação entre grupo jovem e grupo idoso ( $87,11 \pm 3,8^\circ$  vs  $87,16 \pm 3,5^\circ$ ,  $p=0,95$ , *Kruskal-Wallis*). Além disso, também não houve diferença de ângulo da articulação túbio-tarsica no momento do alongamento, quando comparados os grupos jovem e idoso ( $43,9 \pm 4,4^\circ$  vs  $42,6 \pm 6,4^\circ$ ,  $p=0,6$ , *Kruskal-Wallis*).

Quando realizada comparação intragrupos, entre o ângulo da posição neutra e ângulo durante o alongamento, o grupo jovem apresentou diminuição significativa ( $87,11 \pm 3,8^\circ$  vs  $43,9 \pm 4,4^\circ$ ,  $p=0,000$ , teste T pareado), assim como o grupo idoso ( $87,16 \pm 3,5^\circ$  vs  $42,6 \pm 6,4^\circ$ ,  $p=0,000$ , teste T pareado). Os resultados podem ser visualizados na tabela 7.

Tabela 6. Ângulo da articulação talo-crural em ratas jovens e ratas idosas.

	Ratas Jovens	Ratas Idosas
<b>Ângulo da articulação talo-crural em posição neutra</b>	87,1±3,8	87,1±3,5
<b>Ângulo da articulação talo-crural durante o alongamento</b>	43,9±4,4*	42,6±3,4*

Os resultados estão descritos como média±desvio-padrão. \* quando realizada comparação com a posição neutra, intragrupos ( $p=0,000$ , teste T pareado).





### 5.1 Aparato de Alongamento

O aparato foi desenvolvido com o intuito de monitorar e padronizar a força aplicada para promover o exercício de alongamento no músculo de ratos. Os resultados desta etapa do estudo mostraram que o aparato foi eficiente para executar mecanicamente o exercício de alongamento, permitindo o controle da força durante as repetições do protocolo proposto nos grupos de ratas jovens e idosas. Além disso, foram verificadas confiabilidade e linearidade nas medidas da célula de carga durante execução do protocolo de exercício. E ainda, foi necessária menor aplicação de força para promover o alongamento no músculo sóleo das ratas idosas quando comparada com ratas jovens.

Estudos experimentais em ratos, sobre os efeitos do exercício de alongamento no músculo esquelético, utilizam a aplicação de força manual para promover o aumento do comprimento músculo-tendíneo (COUTINHO *et al.*, 2004, 2006; GOMES *et al.* 2004; PEVIANI *et al.*, 2007; PEVIANI *et al.*, 2009; IKEDA *et al.*, 2003), entretanto, não é possível quantificar a força manual aplicada para gerar tal estímulo. Desta forma, o aparato de alongamento desenvolvido nesta pesquisa atingiu o objetivo de promover o alongamento muscular controlando a força aplicada durante sua execução.

Outros autores (CUTLIP *et al.*, 1997) desenvolveram dinamômetro para mensurar a força dos músculos flexores plantares do rato e, analisar a mecânica muscular em situações estáticas e isocinéticas que envolvessem condições de aceleração e movimentos reflexos (CUTLIP *et al.*, 1997). Entretanto, o aparato produzido nesta tese, foi criado a fim de monitorar a força aplicada para induzir mecanicamente o alongamento muscular passivo. Este aparato é constituído de partes ajustáveis que permitem a utilização de animais de diferentes tamanhos e pesos, além de comportar o alongamento do músculo gastrocnêmio ou, isolamento do músculo sóleo, para promover o aumento do comprimento músculo-tendíneo.

Em relação a força aplicada para promover o alongamento muscular, foi observado que esta foi significativamente menor nas ratas idosas, ao longo das repetições, quando comparada com as ratas jovens, concordando com os achados de Gajdosik *et al.* (2004). Estes autores compararam a força (N) passiva máxima,

entre mulheres idosas e jovens quando submetidas a amplitude de movimento máxima na dorsiflexão e, verificaram que a força passiva máxima foi significativamente menor nas mulheres idosas quando comparadas com mulheres jovens, após programa de exercício de alongamento. Estes autores atribuíram tal resultado a sarcopenia combinada ao decréscimo do comprimento músculo-tendíneo de flexores plantares, relacionado ao processo de envelhecimento, o qual contribui para declínio da capacidade dos músculos flexores plantares resistirem ao estiramento passivo e tolerarem o ângulo articular máximo (GAJDOSIK *et al.*, 2004).

De acordo com Carter e colaboradores (2010), com o processo de envelhecimento o músculo sóleo sofre maiores adaptações biomecânicas, morfológicas e moleculares quando comparado com o músculo gastrocnêmio. Estes autores verificaram que o sóleo de ratos idosos apresentou redução significativa da resistência passiva quando comparado com ratos jovens. Estes resultados também foram verificados por Kodama e colaboradores (2012), que conferiram redução da resistência muscular passiva do músculo gastrocnêmio de rato idoso (com 15 meses), submetido a ensaio de tração quando comparado ao músculo de ratos jovens, e tais resultados concordam com os achados da presente tese.

Estudos em humanos demonstram que o músculo idoso, tem como característica, maior rigidez, atribuída a mudanças na viscoelasticidade do tecido conjuntivo (GAJDOSIK *et al.*, 2005; OCHALA *et al.*, 2003). Assim, em geral, idosos apresentam menor massa muscular, e o músculo tende a ser mais fraco e rígido (BATISTA *et al.*, 2009; GALLON *et al.*, 2011). Dessa forma, justifica-se a importância da investigação, tanto clinicamente quanto em nível celular, dos efeitos do exercício de alongamento na adaptação muscular.

Segundo Haus *et al.* (2007) o tecido conjuntivo é importante componente na transferência de força para unidades contráteis do músculo. Entretanto, a transmissão de força e função musculares são alteradas com o envelhecimento pela glicação relacionada às pontes cruzadas do tecido conjuntivo intramuscular.

O exercício de alongamento é uma importante ferramenta na prevenção e tratamento de perdas musculoesqueléticas (KAMIKAWA *et al.*, 2013; WILLIAMS, 1990). Então, torna-se importante elucidar os efeitos do exercício de alongamento em ratos, com o monitoramento da força necessária para induzir o aumento do

comprimento músculo-tendíneo, na tentativa de explicar os mecanismos envolvidos na adaptação musculoesquelética relacionada ao processo de envelhecimento.

Quando foi analisada a força aplicada no final da terceira e oitava repetições, na comparação de ratas jovens e idosas, não houve diferença significativa nos dados. Alguns estudos verificaram tanto em modelos animais (TAYLOR *et al.*, 1990; TAYLOR *et al.*, 1997) quanto em humanos (GAJDOSIK *et al.*, 2005; OCHALA *et al.*, 2003) que ocorrem mudanças nas propriedades viscoelásticas de músculos submetidos a várias repetições de alongamento. Foi verificado que após alongamentos consecutivos ocorre diminuição da tensão muscular nas primeiras três ou quatro repetições (TAYLOR *et al.*, 1990; MAGNUSSON *et al.*, 1996). Estes autores explicam este mecanismo como relaxamento da unidade músculo-tendínea, e isto ocorre inicialmente no tecido conjuntivo devido a mudança conformacional promovida pelo exercício de alongamento (TAYLOR *et al.* 1997).

Willems (2001) realizou alongamento muscular em ratos, estabelecendo o ângulo de 90° da articulação talo-crural como posição neutra e, como dorsiflexão máxima para realizar o alongamento, o ângulo de 40° da articulação talo-crural. Na presente pesquisa, os ângulos articulares apresentaram comportamento similar ao exposto por Willems (2001). Além disso, foi observado que apesar da força aplicada para induzir o alongamento em ratas idosas ter sido menor do que em ratas jovens, não se verificou diferença significativa no ângulo da articulação tíbio-tarsica entre idosas e jovens.

As adaptações morfológicas das fibras musculares (GOMES *et al.* 2004) e do tecido conjuntivo (WILLEMS *et al.*, 2001) parecem estar relacionadas a intensidade, duração e frequência do exercício de alongamento. Estas respostas adaptativas influenciam a flexibilidade e capacidade de gerar força no músculo idoso (GAJDOSIK *et al.*, 2005).

Radford e colaboradores (2006) verificaram em revisão sistemática que, a duração entre 5-30 minutos, do exercício de alongamento é suficiente para promover melhora significativa da ADM dos dorsiflexores, entretanto, afirmaram que os ganhos relacionados a esta variável são dependentes dos parâmetros utilizados. Assim, apesar de não haver consenso na literatura a respeito dos protocolos de alongamento, sabe-se que a escolha dos parâmetros para sua prescrição influencia

diretamente nas respostas adaptativas musculares. Neste sentido, diferentes protocolos de alongamento podem apresentar respostas adaptativas distintas, por exemplo, o alongamento diário realizado 5 vezes por semana, durante uma semana, levou a redução da fibrose tecidual, melhora significativa na regeneração e aumento da força muscular (HWANG *et al.*, 2006). Ainda, o alongamento diário apresentou melhor reorganização do tecido conjuntivo (COUTINHO *et al.*, 2006). Já, o alongamento realizado 3 vezes por semana, preveniu a atrofia muscular (COUTINHO *et al.*, 2004). E, quando realizado 2 vezes por semana, é suficiente para incrementar a ADM de dorsiflexão em idosos (GAJDOSIK *et al.*, 2005; CRISTIANSEN *et al.*, 2009), aumentar o número de sarcômeros em série e a área de secção transversa de fibras do músculo sóleo de ratos (COUTINHO *et al.*, 2004; SECCHI *et al.*, 2008). Na presente pesquisa, sugere-se que os parâmetros de prescrição utilizados possam ter contribuído para redução da resistência muscular passiva em ratas idosas.

Podem ser apontadas algumas limitações nesta etapa da pesquisa, como a ausência da avaliação do comprimento dos fascículos musculares e ângulo de penetração, durante o alongamento, por meio de ultrassom diagnóstico. Porém, a complexidade dos métodos de padronização dos parâmetros para realizar tal análise em ratos, não permitiu a execução desta avaliação.

Considerando a seguinte hipótese do estudo:

H1) O aparato é eficaz para alongar mecanicamente o músculo sóleo de rata.

Os resultados desta etapa da pesquisa mostraram que a hipótese foi aceita: 1) o aparato desenvolvido foi eficiente para monitorar a força aplicada e alongar mecanicamente o músculo sóleo de ratas jovens e idosas. 2) A força aplicada para promover o alongamento em ratas idosas foi significativamente menor do que em ratas jovens.



## EXPERIMENTO

Após padronização da técnica de alongamento e validação do aparato foi iniciado o protocolo de alongamento para avaliação de seus efeitos agudos na histomorfologia e expressão gênica de ratas idosas.

A amostra contou com 15 *Rattus norvegicus*, fêmeas, da linhagem Wistar albino, com 26 meses, divididas aleatoriamente em dois grupos:

- Grupo Controle (GC, n=7): grupo de ratas idosas, não submetido ao protocolo de alongamento, mas submetidas a anestesia inalatória e mantidas por 7 dias no biotério;
- Grupo de Alongamento (GA, n=8): grupo de ratas idosas submetido ao protocolo de alongamento;

Os animais foram distribuídos em cinco caixas (numeradas de 1 a 5), cada uma contendo três animais (numerados de 1 a 3). E para aleatorização, foi sorteado o grupo que cada animal, de cada caixa pertenceria. Assim, os animais do grupo controle e alongamento, permaneceram juntos nas caixas.

Para determinar o número da amostra do experimento, foi considerado o número amostral mínimo de 6 animais por grupo experimental, uma vez que foi estudada uma população homogênea de animais de laboratório (ZAR, 1998). Neste arranjo cada organismo teria a probabilidade de 16% de apresentar um evento distinto.

### 3.2.1 Protocolo de Alongamento Experimento

Para que os animais fossem submetidos ao protocolo de alongamento, foram anestesiados com inalação de isoflurano (5% para 2,5 l O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>) (FIGURA 15A e B) e para manter a anestesia foi utilizada concentração de 2,5% de isoflurano (FIGURA 15C), devido a idade e debilidade das ratas, as mesmas tiveram seus dados vitais (Frequência Cardíaca e Respiratória, temperatura corporal) monitorados durante o procedimento por um médico veterinário especialista em anestesia (FIGURA 15D e E). Ao término do protocolo as ratas permaneceram em placa aquecida para restabelecimento da temperatura corporal e recuperação pós-anestésica (FIGURA 15F). Os animais do grupo controle também foram anestesiados e posicionados no

aparato de alongamento, para que passassem pelo mesmo estresse de manipulação e recuperação pós-anestésica que os animais do grupo alongamento.

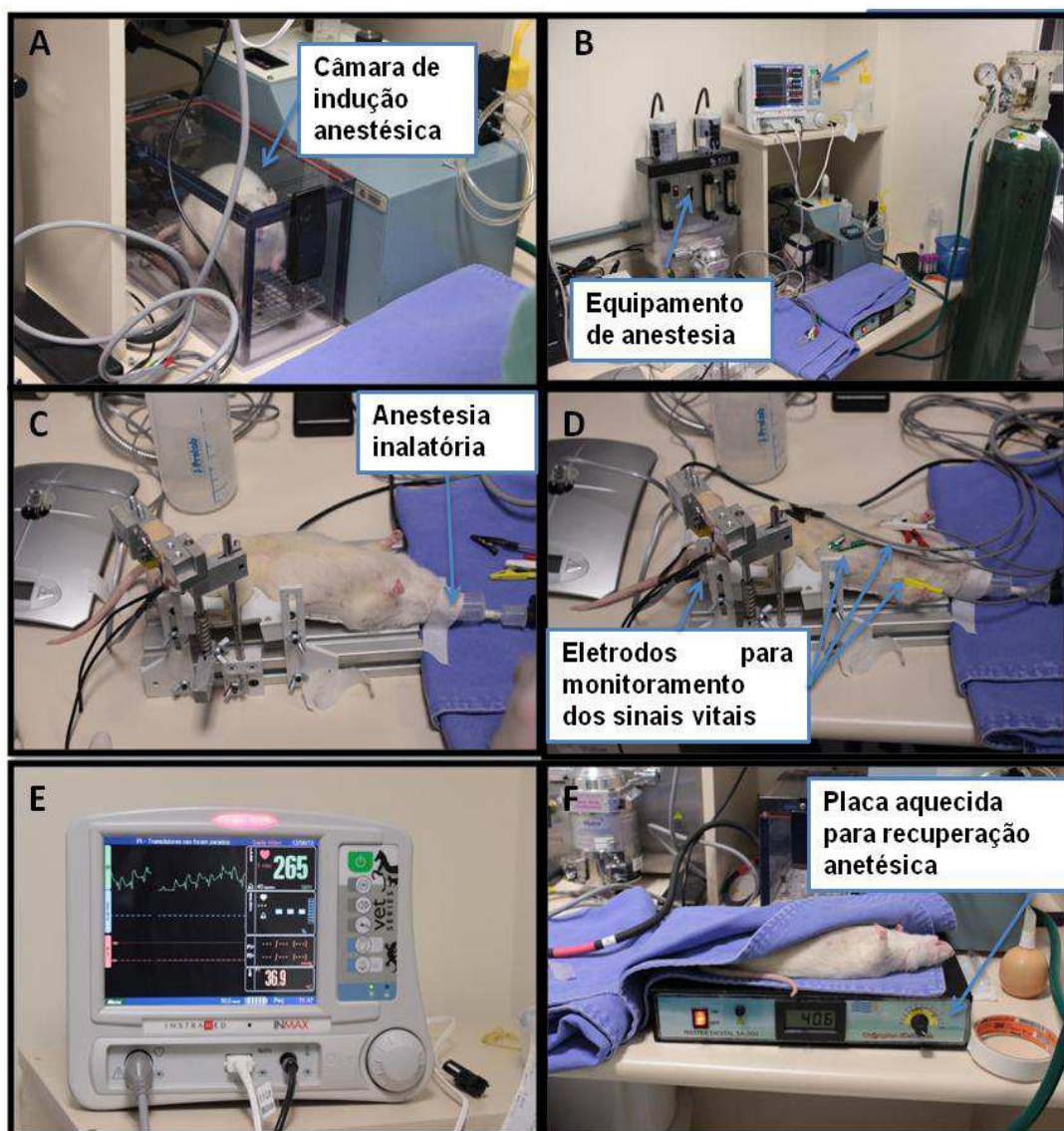


Figura 16: Etapas de indução anestésica. A – Câmara de indução anestésica; B- Equipamento para anestesia inalatória; C – Manutenção de anestesia inalatória durante o protocolo de alongamento; D – Posicionamento de eletrodos para monitoramento dos sinais vitais; E- Monitoramento dos sinais vitais; F – Placa aquecida para recuperação pós-anestésica.

Para efetuar o alongamento passivo no músculo sóleo esquerdo, o animal foi previamente pesado em balança (*Mettler/Toledo*) com capacidade de 25g a 3 Kg, e em seguida anestesiado via inalatória e posicionado no aparato de alongamento com a articulação talo-crural fixada mecanicamente em flexão dorsal máxima para alongamento do músculo sóleo (PEVIANI et al, 2007). O protocolo de alongamento realizado no músculo sóleo esquerdo consistiu em uma série de 4 repetições



(KERRIGAN *et al.*,2003; CRISTOPOLISKI *et al.*,2009, GALLON *et al.*,2011,TAYLOR *et al.*,1990) mantidas por 60 segundos cada repetição (FELAND *et al.*, GALLON *et al.*,2011, CRISTOPOLISKI *et al.*,2009, WATT *et al.*,2011, WATT *et al.*,2001-2) com intervalo de 30 segundos entre cada repetição (KERRIGAN *et al.*, 2003,STAUBER *et al.*, 2002), controlado por cronômetro (*Technos*), 3 vezes por semana (segunda; quarta e sexta-feira) (GALLON *et al.*, 2011, ACSM, 2011), durante uma semana (KAMIKAWA *et al.*,2013, PEVIANE *et al.*,2007), sempre no mesmo horário do dia, no período da manhã.

Os dados referentes à leitura da célula de carga em cada repetição do protocolo de alongamento foram coletados para posterior análise.

### **3.2.2 Métodos De Avaliação**

Após uma semana, no sexto dia do experimento, os animais de ambos os grupos, foram anestesiados por injeção intramuscular de 80mg/kg de ketamina e 8mg/kg de xilasina para coleta do músculo sóleo esquerdo. Em seguida e ainda sob efeito anestésico, foi aplicada injeção intracardíaca de 240mg/kg de ketamina e 24 mg/kg de xilasina para ortotanásia.

Os músculos sóleos esquerdos foram dissecados (FIGURA 16A e B), pesados isoladamente, em balança analítica de precisão (*Mettler/Toledo*) com capacidade mínima de 10mg e máxima 210g. Em seguida, os músculos foram estendidos em uma superfície plana (isopor), para mensuração do comprimento muscular utilizou-se paquímetro eletrônico digital (*Vonder*) e melhor visualização por meio de uma lupa (*Olympus*) (FIGURA 16C). Os músculos foram divididos longitudinalmente, com uma lâmina (*Feather*) (FIGURA 16 D) e (FIGURA 17 B), em duas partes iguais, a porção medial dos músculos sóleos dos animais de cada grupo foi cortado transversalmente, em duas partes iguais, sendo que a porção proximal foi destinada para a técnica de imunohistoquímica e mensuração da área de secção transversa das fibras musculares (FIGURA 17B) e, a porção distal foi destinada para a contagem do número de sarcômeros em série. Toda a porção lateral do músculo sóleo esquerdo foi destinada para avaliação da expressão gênica, para tanto, após a coleta esta parte foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer - 80°C.

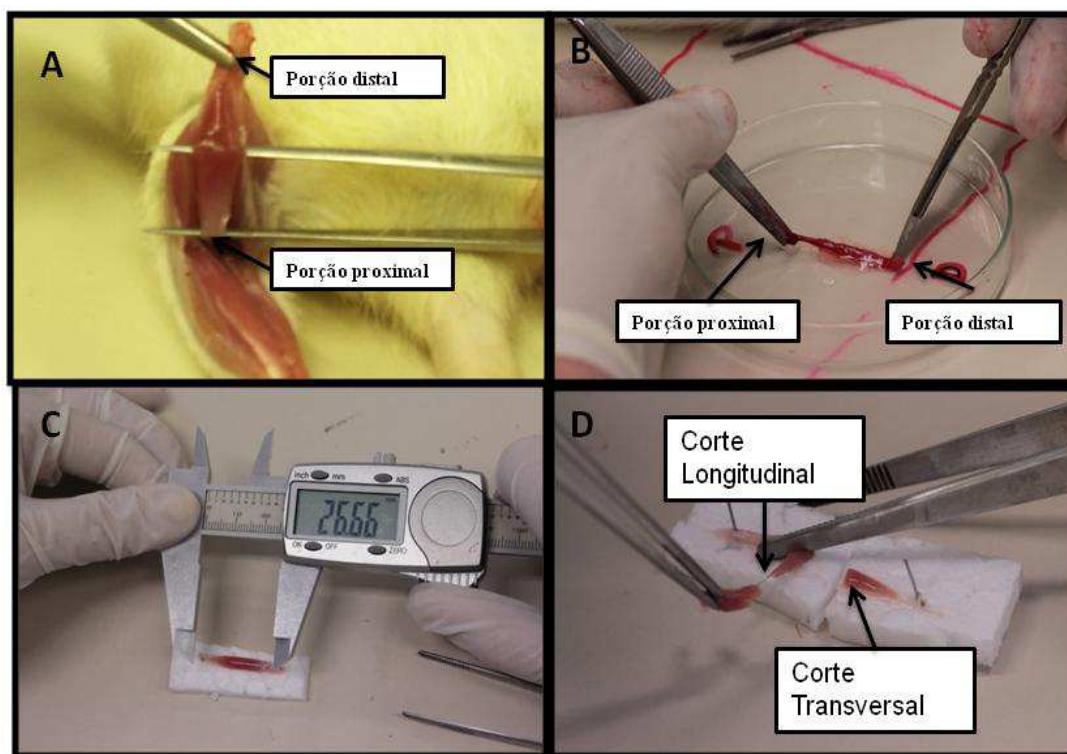


Figura 17. Coleta do músculo sóleo esquerdo. A - Dissecação do músculo sóleo; B – Disposição do músculo sóleo para a mensuração do comprimento muscular, garantindo as posições das porções proximal e distal; C- Mensuração do comprimento muscular com paquímetro; D – Secção longitudinal e transversal do músculo sóleo.

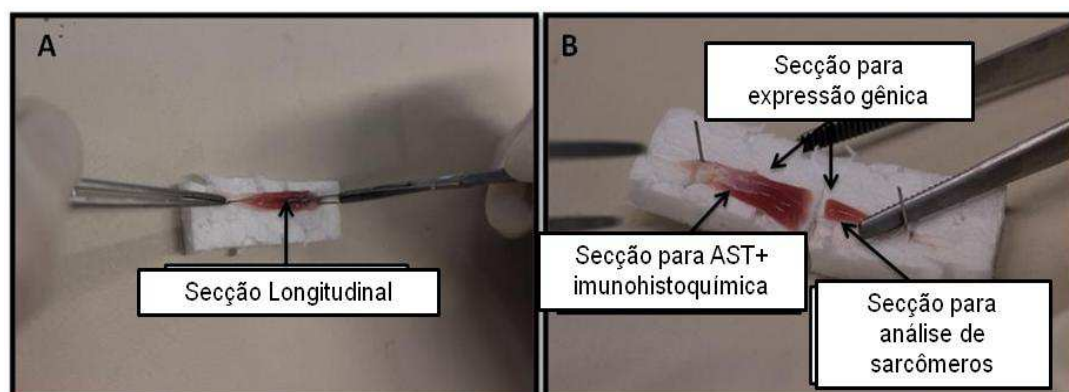


Figura 18. Etapas da secção do músculo sóleo esquerdo. A- Secção longitudinal do músculo sóleo esquerdo, após retirada do animal. B- a porção medial do sóleo foi seccionada transversalmente, em duas partes iguais, sendo a porção proximal destinada para imunohistoquímica e mensuração da área de secção transversa das fibras musculares (ASTFM) e a distal para a contagem do número de sarcômeros em série; Expressão gênica: porção lateral foi destinada à avaliação da expressão gênica.

### 3.2.3 Análise da área de Secção Transversa das Fibras Musculares-ASTFM (Morfometria)

Para fotomicrografia dos cortes histológicos foi utilizado o fotomicroscópio de Luz (Olympus BX50) e capturadas em sistema de vídeo-imagem (câmera Sony CCD

IRIS) por meio do Software Image Pro Plus 4.5. Foram avaliados os cortes transversais histológicos corados com hematoxilina-eosina.

Em cada músculo foram mensuradas a área de 100 fibras musculares, escolhidas de modo aleatório da região do ventre muscular da secção histológica, como descrito por Coutinho *et al.* (2004) e Gomes *et al.* (2004) (FIGURA 18). A ASTFM foi mensurada com o auxílio do software *ImageJ*.

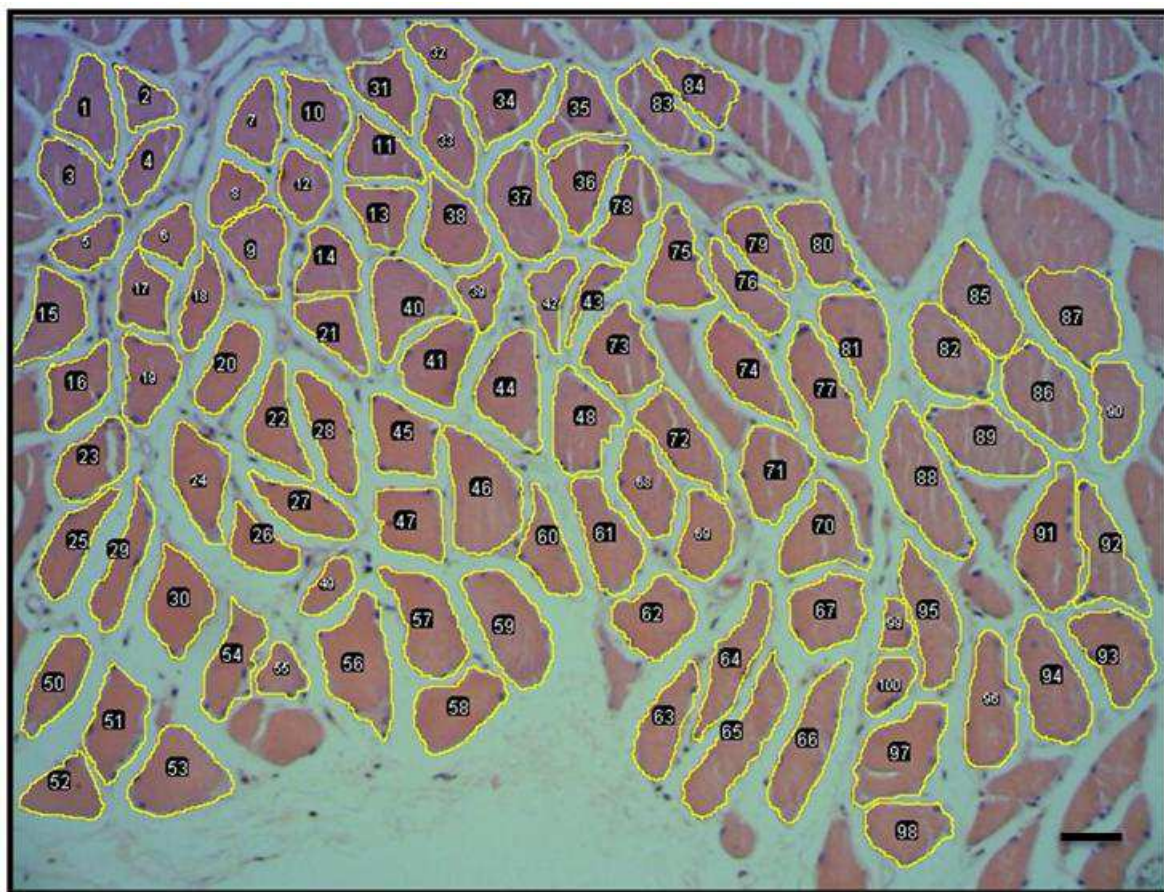


Figura 19. Corte transversal do músculo sóleo corado com HE para mensuração da ASTFM por meio do programa *IMAGE J*. Contorno em amarelo representa delineamento para mensuração da área de secção transversa de cada fibra muscular (ASTFM). Barra = 20µm.

Para análise da ASTFM foi escolhido um corte histológico de cada músculo. Em seguida, o corte selecionado foi focalizado em objetiva de 10x em microscópio de Luz e fotografado em câmera digital. Posteriormente, a imagem foi transferida para um computador, onde 100 fibras foram selecionadas de modo aleatório, na região central da secção histológica e a área de secção transversa de cada fibra foi mensurada através do programa *Image J*.

### 3.2.4 Procedimento para a contagem do número de sarcômeros em série

Para obtenção de fibras musculares isoladas e avaliação do número de sarcômeros em série, a porção distal do músculo sóleo esquerdo foi fixada durante 3 horas em glutaraldeído (2,5%) e em seguida mantida durante 2 dias em ácido nítrico (30%). Posteriormente os músculos foram armazenados em solução de glicerol diluída em água destilada (50%) (GOLDSPINK, 1968).

Em seguida, foram isoladas 10 fibras musculares do ventre de cada músculo sóleo, através da lupa (Olympus) e de pinças ultra finas (Roney). As fibras musculares isoladas foram fixadas em lâmina histológica por meio de esmalte incolor (Risqué). Posteriormente foi contado o número de sarcômeros em série ao longo de 300  $\mu\text{m}$  em cada fibra muscular, em microscópio de luz (objetiva 100x em imersão; microscópio Nikon, modelo Eclipse E 200) (FIGURA 19).

O número total de sarcômeros e o comprimento dos sarcômeros em cada fibra muscular isolada foram estimados pela correlação entre o número de sarcômeros identificados ao longo de 300 $\mu\text{m}$  da fibra e o comprimento total do músculo, como descrito por Williams e Goldspink (1971).

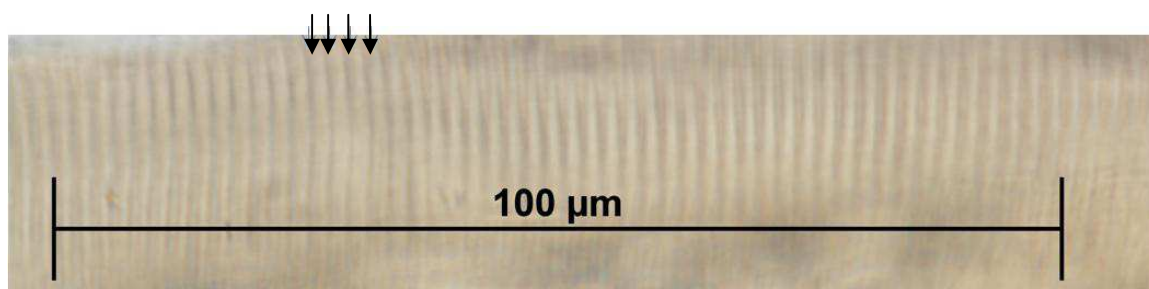


Figura 20: Fotomicrografia (100x em imersão) de fibra isolada de músculo sóleo de rata, preparada para contagem do número de sarcômeros em série. Traçado preto representa 100  $\mu\text{m}$ , indicando a região onde foram contados os sarcômeros em série. Setas exemplificam os sarcômeros contados.

### 3.2.5 Análise Estatística

Inicialmente, os dados foram submetidos aos testes de Homogeneidade e Normalidade, por meio do *Levene* e *Shapiro-Wilk*, respectivamente. Para



comparação entre os grupos, quando foi identificada distribuição normal e homogênea, foram avaliados por meio do teste *ANOVA one-way post hoc* de *Tukey*, no software *Statistic 7.0*. Quando não foi identificada distribuição normal e homogênea, foram considerados não paramétricos e analisados por meio do teste *Kruskall-Wallis*. Foram analisadas as seguintes variáveis: força (N) aplicada para promover o alongamento nas ratas idosas, ao início e final de cada repetição, massa muscular, comprimento muscular, ASTFM, número de sarcômeros em série e comprimento dos sarcômeros. Foram consideradas como variáveis dependentes: força; comprimento muscular; número de sarcômeros em série e ASTFM.

Os pesos corporais iniciais e finais, dentro de cada grupo experimental, foram comparados pelo teste t-pareado. O teste t pareado também foi utilizado para analisar a força (N) aplicada para promover o alongamento muscular, no GA. Os valores foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .



## EXPERIMENTO

### 4.2.1 Força (N) aplicada para promover o alongamento do músculo sóleo

Os dados referentes a força (N) aplicada para promover o alongamento do músculo sóleo nas ratas do grupo alongamento (GA), apresentaram redução significativa quando comparada a força inicialmente aplicada, com a força aplicada ao término de cada repetição do protocolo de alongamento ( $0,48 \pm 0,04\text{N}$  vs  $0,39 \pm 0,04\text{N}$ ,  $p=0,0006$ , teste T pareado, Figura 28).

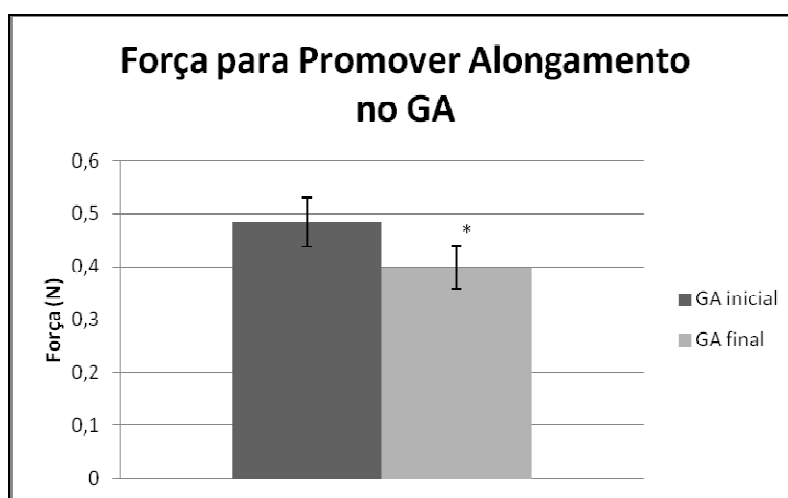


Figura 21. Diferença entre força (N) inicial e final, aplicada para promover o alongamento do músculo sóleo. \* diferença significativa ao comparar força (N) inicial com final,  $p=0,0006$ , teste T Pareado). GA= grupo alongamento; GC= grupo controle.

### 4.2.2 Massa Corporal

O massa corporal apresentou distribuição normal ( $p=0,35$ , *Shapiro-Wilk*) e homogeneidade ( $p=0,56$ , *Levene*) e, não foram encontradas diferenças significativas no massa corporal final, quando realizada comparação entre grupo controle (GC) e grupo alongamento (GA) ( $p = 0,62$ , ANOVA, Figura 29).

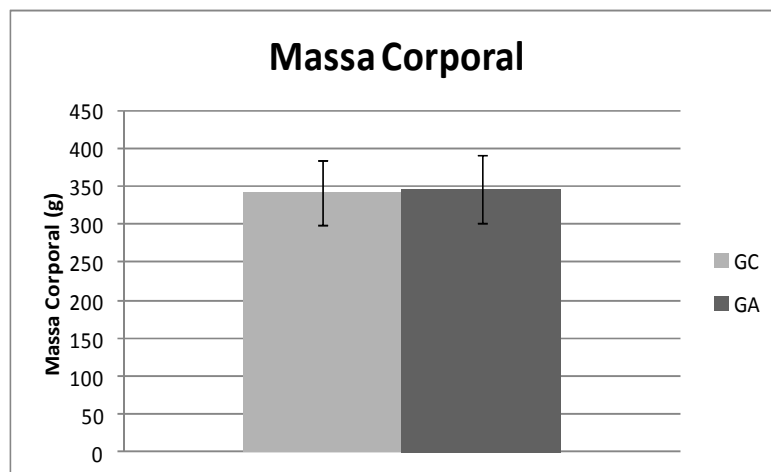


Figura 22. Efeitos agudos do exercício de alongamento na massa corporal (g) ( $p < 0,05$ ). GA= grupo alongamento; GC= grupo controle.

Na diferença relativa, entre as massas corporais iniciais e finais, não foi observado alteração significativa intergrupos ( $p = 0,45$ , ANOVA *one-way*) (TABELA 8).

Tabela 7. Diferença relativa entre Massa Corporal Inicial e Final intergrupos.

Grupos	Massa Inicial (g)	Massa Final (g)	Diferença Relativa (%)	p
GA	348,3±61,8	354,1±52,9	2,7±14,1	0,45
GC	346,4±45,1	341,4±43,3	1,4±0,9	0,45

GA= grupo alongamento; GC= grupo controle. Os resultados estão descritos como a média±desvio padrão ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 Massa Muscular

Os dados apresentaram distribuição normal ( $p = 0,66$ , *Shapiro-Wilk*) e homogeneidade ( $p = 0,56$ , *Levene*) e não foi observada diferença significativa na comparação intergrupos ( $p = 0,38$ , ANOVA *one-way*, Gráfico 6).



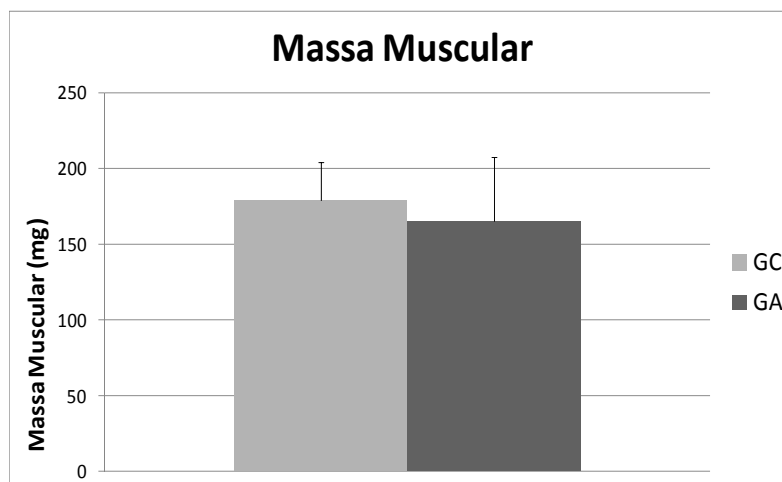


Figura 23. Efeitos agudos do exercício de alongamento na massa muscular (mg). Resultados descritos como média±desvio-padrão ( $p<0,05$ ). GA= grupo alongamento; GC= grupo controle.

Na diferença relativa, entre o peso corporal final e peso muscular, não foi verificada significância estatística intergrupos ( $p=0,43$ , ANOVA *one-way*) (TABELA 9).

Tabela 8. Diferença relativa entre o massa corporal final e massa muscular intergrupos.

Grupos	Massa Corporal Final (g)	Massa Muscular (g)	Diferença Relativa (%)	p ANOVA
GA	354,1±52,9	0,266±0,257	0,08±0,10	0,43
GC	341,4±43,3	0,178±0,025	0,05±0,11	0,43

GA= grupo alongamento; GC= grupo controle. Os resultados estão descritos como a média±desvio padrão ( $p<0,05$ ).

#### 4.2.4 Comprimento Muscular do Sóleo

No que se refere a comprimento do músculo sóleo, os resultados apresentaram distribuição normal ( $p=0,52$ , *Shapiro-Wilk*), mas, não apresentaram homogeneidade ( $p=0,04$ , *Levene*). Não houve diferença significativa na comparação do comprimento muscular intergrupos ( $p=0,78$ , *Kruskal-wallis*, Figura 31).

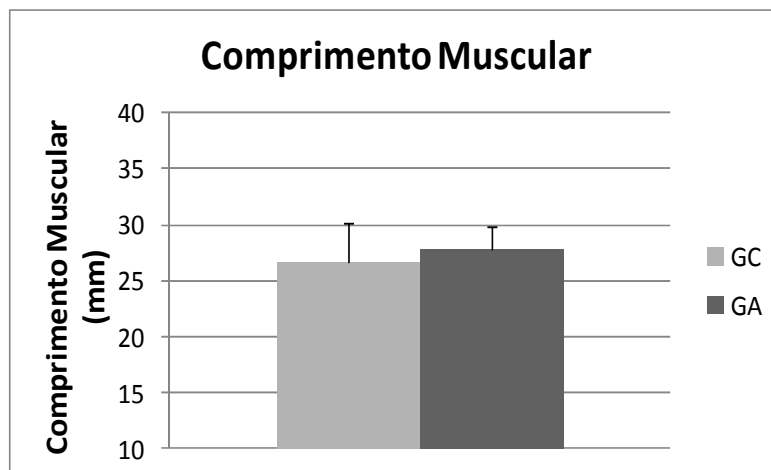


Figura 24. Efeitos agudos do exercício de alongamento no comprimento muscular (mm). Resultados descritos como média±desvio-padrão ( $p < 0,05$ ). GA= grupo alongamento; GC= grupo controle.

#### 4.2.5 Área De Secção Transversa Das Fibras Musculares (ASTFM)

Na análise desta variável os dados não apresentaram distribuição normal ( $p = 0,00$ , *Shapiro-Wilk*) e homogênea ( $p = 0,05$ , *Levene*). As ratas submetidas ao protocolo de alongamento (GA) apresentaram menor área de secção transversa do músculo sóleo, quando esses valores foram comparados ao grupo de ratas controle ( $4148 \pm 1568 \mu\text{m}^2$  vs  $5032 \pm 2125 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,0001$ , *Kruskal-Wallis*, Figura 32).

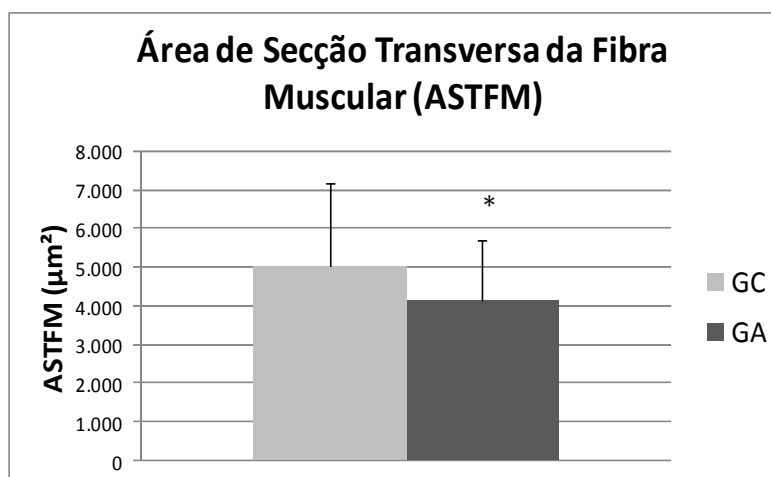


Figura 25. Efeitos agudos do exercício de alongamento na ASTFM ( $\mu\text{m}^2$ ). \* diferença significativa quando comparado com o GC ( $p = 0,0001$ , *Kruskal-Wallis*). Resultados descritos como média±desvio-padrão. GA= grupo alongamento; GC= grupo controle.

#### 4.2.6 Estimativa do número de Sarcômeros em Série

A distribuição dos dados apresentou-se normal ( $p=0.87$ , *Shapiro-Wilk*) e homogênea ( $p=0.59$ , *Levene*). Não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de sarcômeros em série intergrupos ( $p=0,94$ , *ANOVA*, Figura 33).

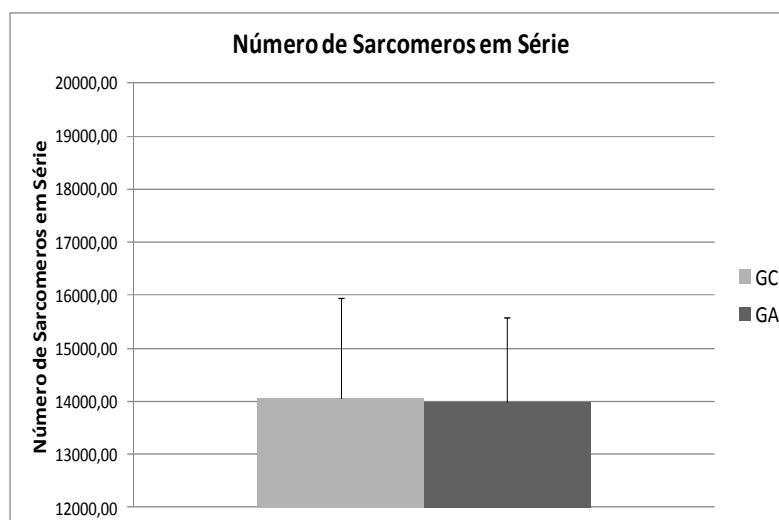


Figura 26. Efeitos agudos do exercício de alongamento no número de sarcômeros em série ( $p=0,94$ , *ANOVA one-way*). Resultados descritos como média  $\pm$  desvio-padrão. GA= grupo alongamento; GC= grupo controle.

#### 4.2.7 Comprimento do Sarcômero

A distribuição dos resultados do comprimento dos sarcômeros não apresentaram normalidade ( $p=0,002$ , *Shapiro-Wilk*) e homogeneidade ( $p=0,00$ , *Levene*), além disso, a comparação entre grupos não mostrou significância estatística ( $p=0,9$ , *Kruskal-Wallis*, Figura 34).

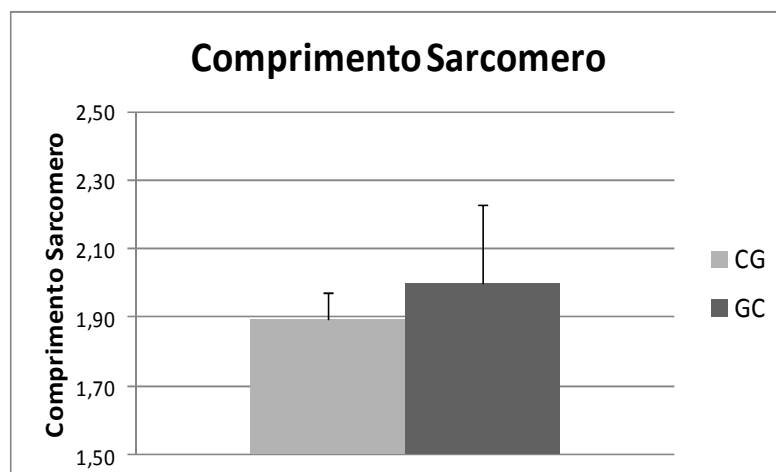


Figura 27. Efeitos agudos do exercício de alongamento no número de sarcômeros em série ( $p=0,9$ , *Kruskal-Wallis*). Resultados descritos como média±desvio-padrão. GA= grupo alongamento; GC= grupo controle.



## **EXPERIMENTO**

Esta etapa da pesquisa envolveu a aplicação de protocolo agudo de alongamento em ratas idosas (com 26 meses), isto é, foi realizado o exercício três vezes por semana, durante uma semana, sendo que os parâmetros de prescrição utilizados foram: 1 série, com 4 repetições de 60 segundos cada, com 30 segundos de intervalo entre cada repetição. Cabe ressaltar que o protocolo proposto foi realizado apenas no membro posterior esquerdo das ratas. Ao término desta etapa, foi verificado que o protocolo de alongamento agudo induziu diminuição da área de secção transversa das fibras musculares, e não induziu sarcomerogênese.

Considerando que as ratas foram anestesiadas via inalatória para o procedimento de alongamento, conjecturava-se que este estresse gerado pela manipulação, indução e recuperação anestésica, pudesse reduzir o peso corporal, conforme reportado em alguns estudos (BALCOMBE, BARNARD e SANDUSCKY, 2004; SECHI *et al.*, 2008). Entretanto, na presente pesquisa não foi observada alteração significativa no peso corporal das ratas idosas, após 1 semana de protocolo de alongamento. Este resultado corrobora com outros autores que realizaram protocolo de alongamento com frequência de 3 vezes por semana, em ratos jovens, e também não observaram modificação no peso corporal do grupo que foi submetido somente ao alongamento (COUTINHO *et al.*, 2004). Portanto, verifica-se que o peso corporal de ratas idosas ao longo de uma semana, sendo submetidas à anestesia e alongamento 3 vezes por semana, apresentou comportamento semelhante aos ratos jovens (COUTINHO *et al.*, 2004).

Em relação ao peso muscular, também não foi verificada alteração quando comparadas ratas idosas e jovens. No entanto, para avaliar o trofismo muscular, sabe-se que a mensuração da área de secção transversa da fibra muscular é melhor do que o peso muscular absoluto (GOMES *et al.*, 2004).

A presente etapa da pesquisa mostrou redução significativa na área de secção transversa das fibras musculares de ratas idosas submetidas ao exercício de alongamento. Outro estudo também reportou diminuição da área de secção transversa das fibras musculares, após protocolo de alongamento, porém, realizado apenas uma vez por semana e em ratos jovens (GOMES *et al.*, 2004). Para explicar

este achado foi sugerido que as vias que regulam o crescimento em série e em paralelo, em resposta ao alongamento, devem ser distintas, já que modificação em paralelo como a atrofia muscular, não necessariamente está acompanhada por diminuição longitudinal, isto é, no número de sarcômeros em série, como também observado no presente estudo (GOMES *et al.*, 2004).

A redução da ASTFM pode ser precedida por mudanças na regulação de genes relacionados à diferenciação muscular e crescimento (MyoD), regulação da massa (miostatina), atrofia (atrogina) e fatores pró-inflamatórios como p38MAPK, NFκB e TNF-α, mesmo em músculos submetidos ao exercício de alongamento (RAMIREZ *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2006; PEVIANI *et al.*, 2007).

Quando foram investigados genes relacionados ao trofismo muscular, conferiram que o gene da atrogina, relacionada com a atrofia muscular, apresentou aumento de expressão em músculo sóleo de ratos jovens submetidos ao alongamento (GOMES *et al.*, 2006; PEVIANI *et al.*, 2007). Portanto, foi observado que uma sessão de alongamento passivo manual, aumentou a concentração de RNAm da atrogina-1, indicando que houve ativação da via ubiquitina-proteossoma no sóleo de rato, o que em parte poderia explicar o decréscimo da área de secção transversa, observada após alongamento das ratas idosas do presente estudo (GOMES *et al.*, 2006; PEVIANI *et al.*, 2007).

A atrofia muscular observada após o protocolo agudo de alongamento nas ratas idosas, pode estar relacionada a diminuição da habilidade de músculos envelhecidos em responder a carga mecânica (BALLAK *et al.*, 2014; RAMASWAMY *et al.*, 2011; KRAGSTRUP *et al.*, 2011). Esta resposta pode ser decorrente da redução da expressão do fator de crescimento, prejudicando a regulação positiva do IGF-1 e MyoD (OWINO, YANG e GOLDSPINK, 2001).

Meng e Yu (2010) afirmaram que a sarcopenia pode estar relacionada com a redução na atividade ou sensibilidade de proteínas sinalizadoras anabólicas, como IGF-1 e Akt. A redução da plasticidade do músculo senescente é refletida na ausência do aumento das concentrações de RNAm do receptor IGF-1 após 5 dias de sobrecarga em músculo, comparada com animais jovens. As isoformas IGF-I e IGF-II são mediadoras de efeitos celulares através da ativação do receptor IGF-I,

que ativam a cascata tirosina-kinase relacionada com o aumento do trofismo muscular (OWINO, YANG e GOLDSPIK, 2001).

A Akt desempenha uma série de papéis importantes para a sarcopenia, que incluem supressão da apoptose e modulação da degradação proteica por inativar a FOXO e inibição da expressão da atrogina-1 e MURF-1 (MENG e YU, 2010; HADDAD e ADAMS, 2006). Portanto, pode-se hipotetizar que o protocolo de alongamento realizado no presente estudo, não foi suficiente para ativar a via da Akt, de maneira a impedir a atrofia no músculo sóleo de ratas idosas, como também sugerido por outros estudos com ratos jovens (SAKAMOTO *et al.*, 2003; PEVIANI *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2006). Concordando com esses resultados, estudo realizado em humanos verificou que o alongamento passivo agudo do músculo sóleo, não apresentou incremento na síntese de proteínas musculares, de maneira a estimular a hipertrofia muscular (FOWLES *et al.*, 2000).

Ainda, foi mostrado que as concentrações basais de fosforilação da Akt no músculo de ratos idosos era aproximadamente duas vezes menor, comparados com ratos jovens (HADDAD e ADAMS, 2006). Assim, verifica-se que enquanto músculo sóleo de ratos jovens submetido ao alongamento, uma vez por semana, diminuiu 8% a área de secção transversa das fibras musculares (GOMES *et al.*, 2004), no presente estudo, observou-se redução de 21% nas ratas idosas submetidas ao alongamento. Este intrigante achado, sugere que o alongamento realizado por apenas 1 semana, regulou negativamente o trofismo muscular. Desta forma, sugere-se para estudos futuros, análises de genes relacionados a atrofia muscular para elucidar os mecanismos envolvidos na diminuição da área de secção transversa induzida pelo alongamento em ratas idosas.

Sobre o comportamento longitudinal em resposta ao alongamento das ratas idosas, não se verificou alteração do comprimento muscular, confirmado com a contagem do número de sarcômeros em série, que também não se modificou. Estudo que utilizou protocolo de alongamento em ratos jovens, sem imobilização prévia, também não identificou sarcomerogênese no músculo gastrocnêmio (PEIXINHO *et al.*, 2014). Por outro lado, Coutinho *et al.* (2004) identificaram aumento do número de sarcômeros em série, após protocolo de alongamento 3 vezes por semana em ratos jovens, porém, este protocolo foi realizado durante 3



semanas consecutivas. Desta forma, observa-se que o tempo em que o protocolo de alongamento é realizado, interfere na adição de sarcômeros em série, mesmo quando o alongamento é realizado de maneira intermitente. Anteriormente, outros autores verificaram que a adição de sarcômeros em série era mais expressiva entre a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semanas de imobilização em posição de alongamento (WILLIAMS e GOLSPINK, 1984).

Já foi reportado por outros estudos que ao submeter o músculo esquelético ao alongamento, dependendo do tipo, da intensidade, duração e frequência deste exercício, pode ocorrer adição de sarcômeros em série (COUTINHO *et al.*, 2004; SECCHI *et al.*, 2008; CAÇÃO-BENEDINI *et al.*, 2013). Porém, estes estudos foram realizados com ratos jovens, sugerindo que a sarcomerogênese pode ocorrer mais rapidamente e de maneira mais expressiva. Na presente pesquisa, a amostra era composta por ratas idosas (ANDREOLLO *et al.*, 2012; NISTAR *et al.*, 2012), e mesmo com período de intervenção semelhante ao estudo de Cação-Benedini *et al.*, (2013), não foi encontrado aumento do número de sarcômeros em série em ratas idosas.

O crescimento muscular e atrofia são dois fenômenos distintos que são mecanicamente ligados. A inatividade ou atividade de uma série comum de moléculas controlando uma série de vias de sinalização celular determinam se o tecido muscular esquelético irá responder aos estímulos definidos com aumento da síntese ou quebra proteica e redução da proliferação celular. Assim, acredita-se que esses dois processos sejam a chave para a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da massa muscular esquelética (TOIGO e BOUTELLIER, 2006).

Dessa forma, a idade das ratas pode ter sido fator determinante para impedir a sarcomerogênese, tendo em vista que a transdução de sinal celular é baseada no *background* genético, idade, sexo, com a resposta celular e molecular culminando em adaptações estruturais específicas (TOIGO e BOUTELLIER, 2006).

E ainda, sabe-se que fatores de crescimento participam da hipertrofia, os quais envolvem o crescimento muscular em série e paralelo (KOSTEK *et al.*, 2007). Assim, pode-se supor que a diminuição do hormônio de crescimento pode impedir a

sarcomerogênese em músculos idosos (BIRBRAIR *et al.*, 2013; KRAGSTRUP *et al.*, 2011; NILLWIK *et al.*, 2013).

Considerando as seguintes hipóteses da pesquisa:

H0) O alongamento muscular agudo não interfere na morfologia, porcentagem de colágeno I e III e TGF $\beta$  -1, e expressão gênica de TGF $\beta$  -1 nas fibras musculares de ratas idosas;

H2) O exercício de alongamento muscular agudo aumenta o número sarcômeros em série em músculos de ratas idosas.

H3) O exercício de alongamento muscular agudo aumenta a área de secção transversa nos músculos de ratas idosas.

Todas foram rejeitadas, pois, verificou-se que o protocolo de alongamento proposto interferiu na histomorfometria muscular, não apresentando sarcomerogênese e promovendo a hipotrofia muscular. Dessa forma, na tentativa de elucidar os mecanismos que levaram a atrofia muscular e ausência de sarcomerogênese no músculo idoso submetido a exercício de alongamento agudo, foi investigado na etapa 3 desta pesquisa, o fator- $\beta$ -1 de crescimento TGF $\beta$ -1. Sabe-se que altas concentrações de TGF $\beta$ -1 no tecido muscular, estão relacionadas a formação de tecido fibrótico, que prejudica o desempenho muscular e pode levar a atrofia muscular (BURKS e CONH,2011; SMITH *et al.*,2007). E, considerando o mecanismo de mecanotransdução, no qual a resposta adaptativa inicia-se na MEC (DE DEYNE,2001), foi analisado o comportamento do colágeno I e III no músculo de ratas idosas.



## TÉCNICA DE IMUNOHÍSTOQUÍMICA

A porção proximal do músculo sóleo esquerdo coletado dos dois grupos de ratas idosas, após cortes longitudinal e transversal, foi fixada em formalina 10% durante 48 horas, posteriormente os fragmentos foram desidratados e diafanizados, seguindo o protocolo: álcool 70%, 80%, 90%, 95% por 30 min; álcool 100% (I e II) por 30 min e xilol (I e II) por 15 min.

Essas amostras foram emblocadas em parafina e cortadas no micrótomo (*Leica* RM 2145) a 4 µm e em seguida os cortes foram aderidos nas lâminas (*AutoWrite Green Adesin Sakura* 76 X 26 mm). Após, foi realizada a secagem das lâminas *overnight* a 60° C em estufa (*Orion*- modelo 502). Posteriormente foi realizada a desparafinização, usando xilol 100% em temperatura ambiente (2 vezes de 10 min); álcool etílico absoluto (3 vezes de 1 min); álcool etílico 80% (1 vez de 1 min).

Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% (peróxido diluído em metanol). Logo após foi lavado em água destilada (FIGUA 20 A). Em seguida foi efetuada a recuperação antigênica: sendo as lâminas mergulhadas em recuperador *ImunoRetriver* (Dako®), em cuba de banho-maria (*Ancap*), à 98° C, por 40 min.

Após, foram deixadas esfriar à temperatura ambiente (FIGURA 20B). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, e, lâmina por lâmina foi riscada com caneta hidrofóbica *Dako pen* (Dako®), delimitando a área do corte.

Ainda, as lâminas permaneceram em tampão PBS (tampão fosfato-salina) tris pH 7,3 (FIGURA 20C), até que as alíquotas de anticorpo fossem gotejadas, evitando a secagem do corte (FIGURA 20D).

As alíquotas (100 µl) das soluções dos anticorpos Monoclonal Anti-Collagen Type I (COL-1, Sigma), Monoclonal Anti-Collagen Type III (FH-7A, Sigma) e Monoclonal Mouse Anti-TGFβ-1 (2C5, Santa Cruz), foram gotejadas sobre os cortes e levadas em câmara úmida (*Easy path*) à geladeira (*Consul*) *overnight* (FIGURA 20E).

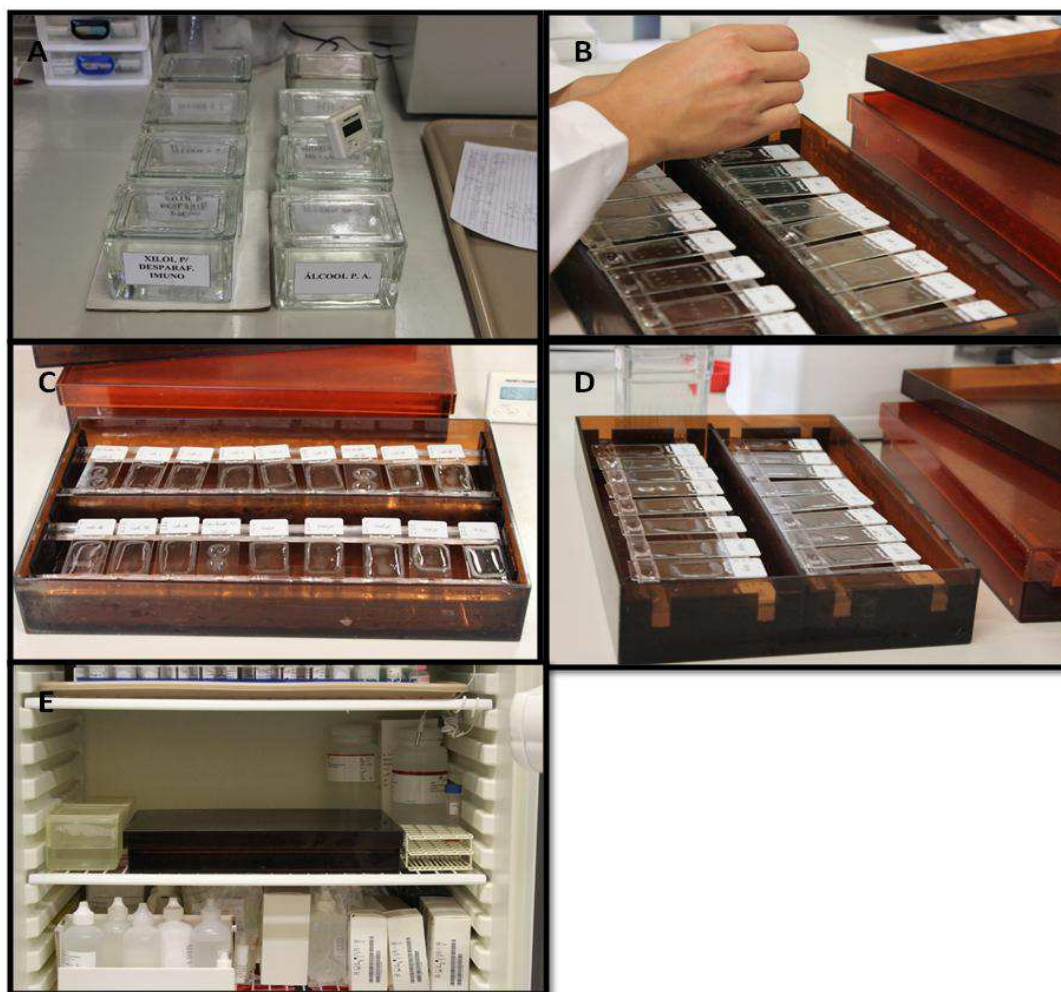


Figura 28. Confeccção das lâminas de imunohistoquímica. A – Desparafinizaçãodas lâminas e bloqueio da peroxidase endógena; B- Lâminas resfriando a temperatura ambiente; C - lâminas em tampão TBS; D – lâminas com alíquotas do anticorpo; E – Posicionamento da câmara úmida na geladeira *overnight*.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em tampão TBS tris pH 7,3 e deixadas no tampão por 15 min. Novamente foram lavadas em tampão, secadas e então pingado Advance link (Dako®) e deixado por 30 min. Em seguida, foram lavadas em tampão e gotejado Advance enzyme (Dako®) e deixado por 30 min. Após, foi lavado em tampão, secado e pingado cromógeno DAB (1:1) até a visualização da cor castanha e então, foi lavada rapidamente em água destilada. Na sequência, foi contracorado com Hematoxilina de Harris por 5 min, lavado em água da torneira e deixado por 5 min. Desidratado com álcool etílico absoluto (3x 1 min.). Diafanizado com xilol (3 x 5 min). Após foi realizada montagem da lâmina com Entellan® (Merck, Germany).

Para detectar a imunoatividade foi utilizado o kit ImmPRESS™ (Anti-Mouse/Rabbit Ig Reagent, Vector Labs, US) conjugado com peroxidase de acordo com as instruções do fabricante. A coloração foi desenvolvida por meio do Kit ImmPACT™ DAB (Vector Labs, US).

### 3.3.1 Análise Imunohistoquímica

As lâminas dos anticorpos colágeno I, colágeno III e TGFβ-1 foram analisadas por método quantitativo morfométrico (KONDO *et al.*, 2011).

Para a leitura dos anticorpos colágeno I, colágeno III e TGFβ-1, foi utilizado o programa *Image Pro Plus*® com o auxílio de câmera *Dino-eye*® e de microscópio óptico BX50 (Olympus®) (objetiva de 40x). Os anticorpos dos anticorpos colágeno I, colágeno III e TGFβ-1, coram o epimísio, endomísio e endomísio/perimísio, respectivamente, em castanho, quando positivo.

Fotomicrografia em campo de grande aumento (400X) foi realizada de uma lâmina controle positiva. O observador forneceu ao programa amostra da coloração castanha considerada positiva nesta fotomicrografia da lâmina controle para permitir a quantificação do colágeno I (FIGURA 21A), colágeno III (FIGURA 21B) e TGFβ-1 (FIGURA 21C) pelo método de colorimetria (RECHERT-FARIA, 2012). Esta fotomicrografia passou a ser a “máscara”, de acordo com Calvi e colaboradores (2012), a máscara é confeccionada a partir de estrutura específica que é demarcada em uma imagem. Dessa forma, após selecionar a estrutura específica, o programa identificou os *pixels* da estrutura e, a partir disso, o *software* selecionou *pixels* adjacentes com cores similares (CALVI *et al.*, 2012).

Neste estudo, os *pixels* selecionados foram da cor castanha para os colágenos I e III e TGFβ-1. Assim, após esta seleção, foi possível a visualização das máscaras referentes ao colágeno I, III e TGFβ-1, como pode ser conferido nas figuras 21D,E e F, respectivamente.



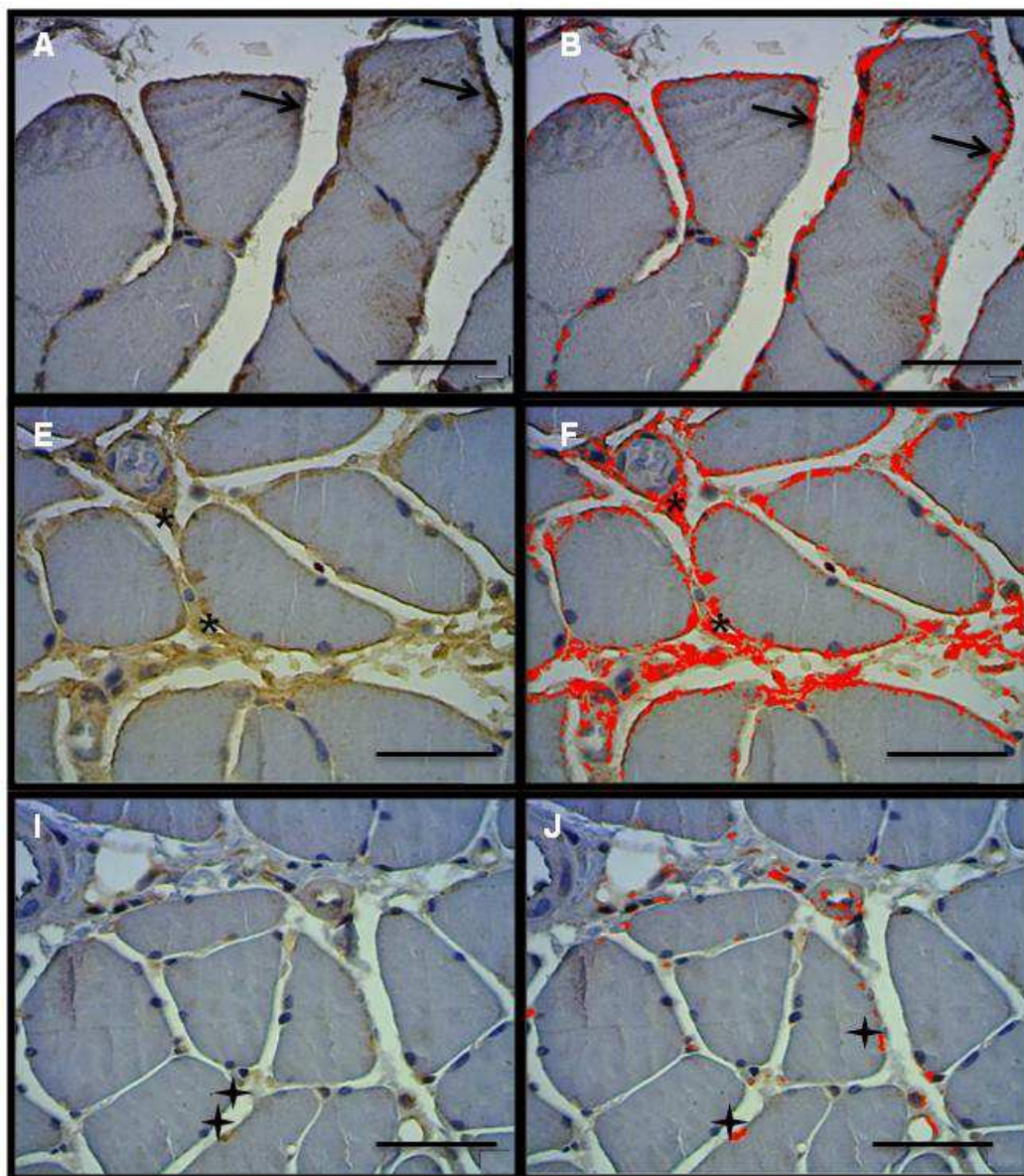


Figura 29. Corte transversal do músculo sóleo, técnica de imunohistoquímica. A – setas indicam marcação imunopositiva para o colágeno I; B – máscara para análise colágeno I (região com cor vermelha demonstra imunopositividade); C- \* marcação imunopositiva para o colágeno III D – máscara para análise colágeno III (região com cor vermelha demonstra imunopositividade); E – demonstram marcação imunopositiva para o TGFβ-1; F – máscara para análise TGFβ-1 (região com cor vermelha demonstra imunopositividade). Barra = 200µm

Na sequência, o programa automaticamente identificou as áreas imuno-positivas, isto é, a tonalidade castanha padronizada no campo selecionado, demarcando na cor vermelha, permitindo quantificar a área do colágeno I, colágeno III e TGFβ-1. Para cada caso foram fotografados 10 campos da esquerda para a direita e de cima para baixo, de cada lâmina histológica, de cada sóleo de cada rato, de todos os grupos experimentais. No final, foram selecionadas 5 imagens que

continham menos artefatos e maior quantidade de fibras musculares. Consideraram-se artefatos depósitos de reagentes, fibras dobradas, rasgadas ou mal focalizadas.

Para excluir qualquer influência da quantidade de área de fibra muscular, cada lâmina, de cada animal, teve o total de área muscular calculada pelo programa Image Pro Plus. Dessa forma, a porcentagem de colágeno I, colágeno III e TGF $\beta$ -1 foi estimada considerando a área total da fibra muscular por lâmina fotografada. Primeiramente, para calcular a área total de fibra muscular por lâmina, foram selecionadas todas as fibras musculares em aumento 400x, correspondendo a 100% da área de fibra muscular. A seguir, a cor castanha foi selecionada representando colágeno I, colágeno III ou TGF $\beta$ -1, permitindo estimar a porcentagem imuno-positiva por área de fibra muscular total.

Após a leitura de 5 imagens, foi calculada a média aritmética das porcentagens de colágeno I, colágeno III e TGF $\beta$ -1, de cada animal. Ainda foi calculada a relação entre a proporção de colágeno I e colágeno III intra e intergrupos, para este cálculo foi considerada a média da porcentagem de colágeno I como numerador, e a média da porcentagem de colágeno III como denominador, assim, a razão numerador e denominador do grupo controle foi considerada como valor de referência.

### **3.3.2 Análise Estatística**

Inicialmente, os dados foram submetidos aos testes de Homogeneidade e Normalidade, por meio do *Levene* e *Shapiro-Wilk*, respectivamente. Para comparação entre os grupos, caso apresentassem distribuição normal e homogênea, foram avaliados por meio da *ANOVA one-way post hoc Tukey*. Quando os resultados não apresentaram distribuição normal e homogênea, foram considerados não paramétricos e analisados por meio do teste *Kruskal-Wallis*. Os valores foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ . Foram consideradas variáveis dependentes : porcentagem de colágeno I, III e TGF- $\beta$ .





## IMUNOHISTOQUÍMICA

### 4.3.1 Porcentagem de Colágeno I por área total de fibra muscular

A área do colágeno I foi expressa em porcentagem por área total de fibra muscular. Os dados obtiveram distribuição normal ( $p=0,69$ , *Shapiro-Wilk*), porém não apresentaram homogeneidade ( $p=0,00$ , *Levene*). No que diz respeito a área total de imunopositividade para o colágeno I, o GA foi estatisticamente menor quando comparado ao GC ( $p=0,00$ , *Kruskal-Wallis*, Tabela 10). A área total de fibra muscular não apresentou significância estatística na comparação intergrupos ( $p=0,88$ , *ANOVA*, Tabela 10). Em relação a porcentagem de colágeno I, por área total de fibra muscular, o GA apresentou redução significativa quando comparado ao GC ( $p=0,00$ , *Kruskal-Wallis*, Tabela 10).

Tabela 9. Comparação da porcentagem de Colágeno I no músculo sóleo das ratas idosas.

Grupos	Área total de imunopositividade ( $\mu\text{m}^2$ )	Área total de fibra muscular ( $\mu\text{m}^2$ )	Porcentagem de Colágeno I por área total de fibra muscular (%)
<b>GC</b>	996 $\pm$ 1013	137.043,05 $\pm$ 19.334	1,67 $\pm$ 1,91
<b>GA</b>	752 $\pm$ 547*	88.980 $\pm$ 14.231	1,41 $\pm$ 1,21‡

GA= grupo alongamento; GC= grupo controle. Os resultados estão descritos como a média $\pm$ desvio padrão. \*quando comparado ao GC ( $p=0,00$ , *Kruskal-Wallis*); ‡quando comparado ao GC ( $p=0,00$ , *Kruskal-Wallis*).

A figura 35 demonstra a diferença entre a deposição de colágeno I nos grupos controle (35A) e alongamento (35B).

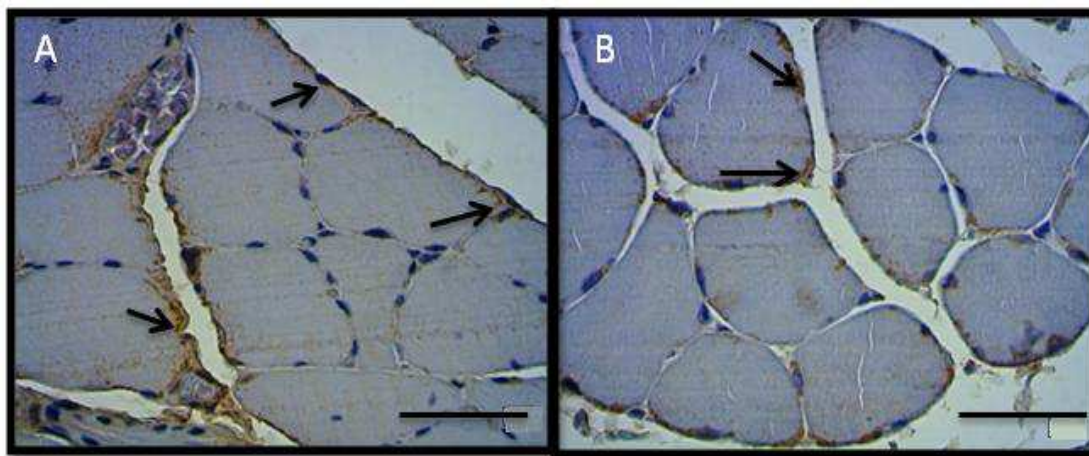


Figura 30 – Corte transversal do músculo sóleo, técnica de imunohistoquímica. Comparação de imunopositividade intergrupos para colágeno I. A – Grupo Controle (GC); B – Grupo alongamento (GA), note que a deposição é menor quando comparada ao Grupo Controle (GC) (A). Setas demonstram marcação positiva. Barra 200 $\mu$ m.

#### 4.3.2 Porcentagem de Colágeno III por área total de fibra muscular

A distribuição dos resultados referentes a análise do colágeno III, apresentaram normalidade ( $p=0,81$ , *Shapiro-Wilk*), porém, não exibiram homogeneidade ( $p=0,00$ , *Levene*). A tabela 9 apresenta a ocupação do colágeno III por área total de fibra muscular, por grupo. A área total de imunopositividade para este colágeno foi significativamente maior no GA quando comparado ao GC ( $p=0,00$ , *Kruskal-Wallis*). A comparação de área total de fibra muscular intergrupo, não apresentou significância estatística na comparação intergrupos ( $p=0,55$ , *ANOVA*). E ainda, a porcentagem de colágeno III, por área total de fibra muscular, teve aumento expressivo no GA, quando comparado ao GC ( $p=0,00$ , *Kruskal-Wallis*, Tabela 11).

Tabela 10. Comparação da porcentagem de Colágeno III entre grupo controle e alongamento

Grupos	Área total de imunopositividade ( $\mu\text{m}^2$ )	Área total de fibra muscular ( $\mu\text{m}^2$ )	Porcentagem de Colágeno III por área total de fibra muscular (%)
<b>GC</b>	2.924 $\pm$ 2.210	67.412 $\pm$ 12.159	4,92 $\pm$ 5,30
<b>GA</b>	3.915 $\pm$ 2.864*	69.349 $\pm$ 15.524	7,06 $\pm$ 6,88‡

GA= grupo alongamento;GC= grupo controle. Os resultados estão descritos como a média $\pm$ desvio padrão. \*quando comparado ao GC ( $p=0,00$ , *Kruskal-Wallis*); ‡quando comparado ao GC ( $p=0,00$ , *Kruskal-Wallis*).

A figura 36 demonstra a diferença entre a deposição de colágeno III nos grupos controle (36A) e alongamento (36B).

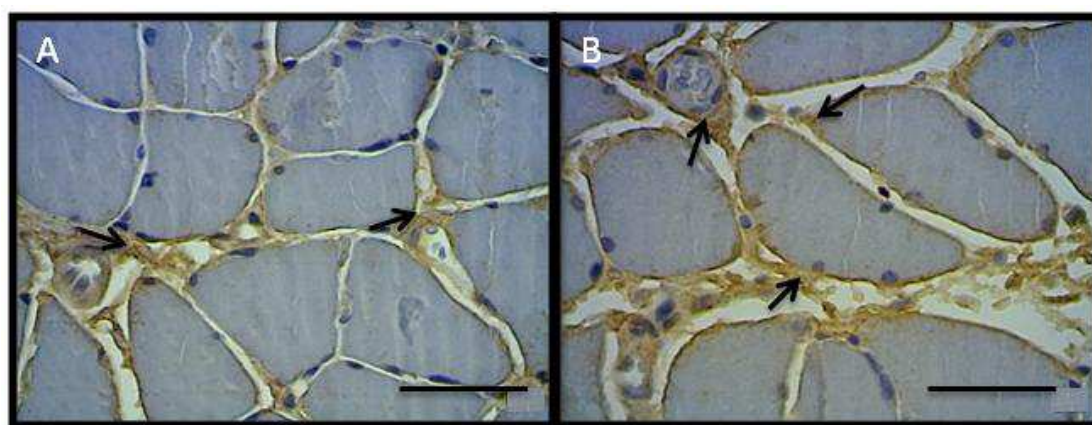


Figura 31 - Corte transversal do músculo sóleo, técnica de imunohistoquímica. Comparação de imunopositividade intergrupos para colágeno III. A – Grupo Controle (GC); B – Grupo alongamento (GA), note que a deposição é maior quando comparada ao GC (A).Setas demonstram marcação positiva. Barra 200 $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.3 Porcentagem de TGF $\beta$ -1 por área total de fibra muscular

No que diz respeito a distribuição dos resultados da avaliação do TGF $\beta$ -1, houve normalidade ( $p=0,66$ , *Shapiro-Wilk*), entretanto não foi observada homogeneidade ( $p=0,00$ , *Levene*).

A análise da área de imunopositividade do TGF $\beta$ -1, foi significativamente menor no GA quando comparado ao GC ( $p=0,02$ , *Kruskal-Wallis*, Tabela 12). Já a área total de fibra muscular não apresentou significância na comparação intergrupos ( $p=0,05$ , *Kruskal-Wallis*, Tabela 12). E, a porcentagem de TGF $\beta$ -1 por área total de

fibra muscular foi expressivamente menor no GA quando comparado ao GC ( $p=0,04$ , *Kruskal-Wallis*, Tabela 12).

Tabela 11. Comparação da porcentagem de TGF $\beta$ -1 no músculo sóleo de ratas idosas.

Grupos	Área total de imunopositividade ( $\mu\text{m}^2$ )	Área total de fibra muscular ( $\mu\text{m}^2$ )	Porcentagem de TGF $\beta$ -1 por área total de fibra muscular (%)
<b>GC</b>	1.280 $\pm$ 1.871	72.102 $\pm$ 13.606	1,90 $\pm$ 2,85
<b>GA</b>	1.009 $\pm$ 928*	72.663 $\pm$ 12.961	1,60 $\pm$ 1,69‡

GA= grupo alongamento; GC= grupo controle. Os resultados estão descritos como a média $\pm$ desvio padrão. \*quando comparado ao GC ( $p=0,02$ , *Kruskal-Wallis*); ‡quando comparado ao GC ( $p=0,04$ , *Kruskal-Wallis*).

A figura 37 demonstra a diferença entre a deposição de TGF $\beta$ -1 nos grupos controle (37A) e alongamento (37B).

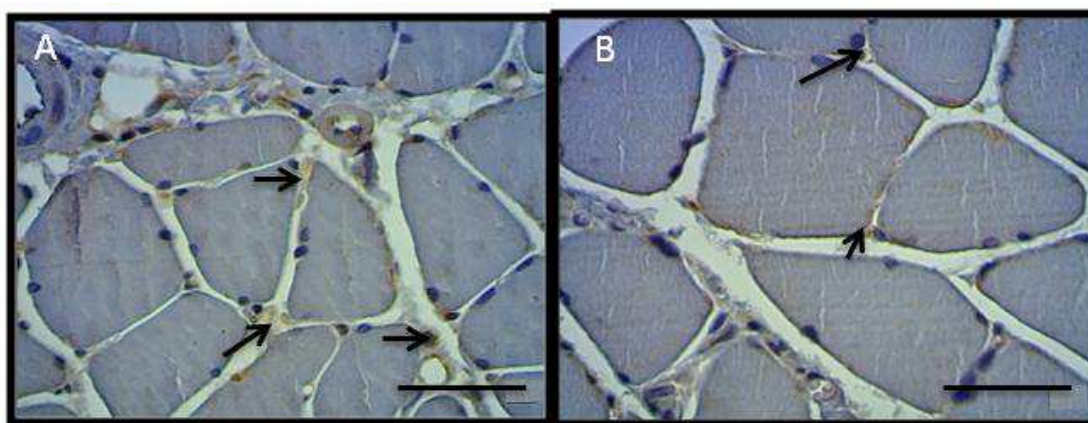


Figura 32 Corte transversal do músculo sóleo, técnica de imunohistoquímica. Comparação de imunopositividade intergrupos para TGF $\beta$ -1. A – Grupo Controle (GC); B –Grupo Alongamento (GA), note que a deposição é menor quando comparada ao GC (A).Setas demonstram marcação positiva. Barra 200 $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.4 Relação entre Colágeno I e Colágeno III por área de fibra muscular

A distribuição dos resultados não apresentaram normalidade ( $p=0,00$ , *Shapiro-Wilk*), e homogeneidade ( $p=0,00$ , *Levene*). A análise intergrupos mostrou

que esta relação foi significativamente menor no GA quando comparado ao GC (0,19 vs 0,34,  $p=0,00$ , *Kruskal-Wallis*, Tabela 13).

Tabela 12. Relação entre Colágeno I e Colágeno III por área de fibra muscular do sóleo de ratas idosas.

Grupos	Porcentagem de imunopositividade Colágeno I (%)	Porcentagem de imunopositividade Colágeno III (%)	Relação entre I e colágeno III por área total de fibra muscular
<b>GC</b>	1,67±1,91	4,92±5,30	0,34
<b>GA</b>	1,41±1,21	7,06±6,88	0,19*

\*significativo quando comparado ao GC ( $p=0,00$ , *Kruskal-wallis*); Os resultados são descritos como média  $\pm$  desvio-padrão. GC- Grupo Controle; GA- Grupo Alongamento.



## **IMUNOHISTOQUÍMICA**

A presente etapa envolveu a investigação dos efeitos do protocolo agudo de alongamento em ratas idosas (com 26 meses), conforme descrito no item 4.2, por meio de análise imunohistoquímica do fator de crescimento TGF $\beta$ -1, colágeno I e colágeno III.

Verificou-se que as concentrações de TGF $\beta$ -1 foram significativamente menores no grupo alongamento quando comparado ao grupo controle. Desta forma, sugere-se que o exercício de alongamento agudo deve atuar como modulador da atividade do TGF $\beta$ -1, promovendo diminuição de deposição de tecido fibrótico no músculo esquelético.

O TGF $\beta$ -1 é importante mediador da síntese de colágeno, a qual é mecanicamente induzida por fibroblastos (YANG *et al.*, 2004). Estudo que avaliou os efeitos do treinamento excêntrico, concêntrico e isométrico na expressão gênica do TGF $\beta$ -1 e colágeno em ratos, verificou que o aumento da síntese de colágeno I no músculo é diretamente proporcional ao aumento das concentrações de TGF $\beta$ -1, e que a tensão gerada no músculo pelo aumento do comprimento músculo-tendíneo, durante o exercício excêntrico, estimula a síntese de colágeno I quando comparado aos exercícios concêntricos e isométricos (HENEIMEIER *et al.*, 2007).

Portanto, apesar de ser observada na etapa 2, que houve atrofia muscular no grupo de ratas idosas submetidas ao alongamento, observou-se redução da porcentagem de TGF $\beta$ -1, sugerindo que a proliferação do tecido conjuntivo foi impedida, como observado por outros autores, que mantiveram o sóleo de ratos jovens imobilizado em posição de alongamento (WILLIAMS *et al.*, 1988; COUTINHO *et al.*, 2006). Este achado pode ter representação clínica, já que, impedir a proliferação de tecido conjuntivo é estratégia para prevenir a redução da flexibilidade em idosos (HOLLAND *et al.*, 2002).

Em estudo realizado com células, divididas em dois grupos, um com suplementação de alta concentração de TGF $\beta$ -1, e outro grupo com baixa concentração de TGF $\beta$ -1, foi realizado alongamento cíclico destas células, e



verificou-se que no grupo suplementado com alta concentração de TGF $\beta$ -1, houve aumento da deposição de colágeno I (SEYDAN e TRANQUILO, 2011).

Em relação ao colágeno I, no presente estudo, observou-se redução significativa na porcentagem por área de fibra muscular no grupo de ratas idosas alongadas e, neste mesmo grupo, houve aumento significativo da porcentagem de colágeno III por área de fibra muscular.

Cação-Benedini e colaboradores (2013) aplicaram protocolo de alongamento em ratas jovens após período de imobilização e verificaram que após um dia de alongamento, as ratas apresentaram aumento na concentração de colágeno tipo III e, além disso, no terceiro dia de protocolo de alongamento, esta concentração se manteve, corroborando com os dados do presente estudo, onde a concentração de colágeno III foi significativamente maior no grupo de ratas idosas alongadas.

Já em relação ao colágeno tipo I, os mesmos autores verificaram em ratas jovens que sua concentração foi menor quando comparada à concentração de colágeno III e ainda, a concentração de colágeno tipo I foi significativamente menor no grupo imobilizado e alongado, quando comparado ao grupo controle, concordando com os achados do presente estudo. Entretanto, estes autores mostraram que as concentrações tanto de colágeno I quanto de colágeno III, permaneceram as mesmas entre o primeiro e terceiro dias de protocolo de alongamento sem imobilização. Em contrapartida, o grupo que foi imobilizado e deixado livre na gaiola, apresentou decréscimo nas concentrações de colágenos I e III entre o primeiro e terceiro dias de protocolo. Assim, sugere-se que os músculos das ratas idosas submetidas ao alongamento no presente estudo, apresentaram comportamento semelhante ao de ratas jovens que foram previamente imobilizadas e submetidas ao alongamento (CAÇÃO-BENEDINI *et al.*, 2013).

Jarvinen e colaboradores (2007) sugeriram que as mudanças ocorridas no tecido conjuntivo intramuscular contribuem para a perda funcional e propriedades biomecânicas do musculoesquelético imobilizado. Estas consequências podem alterar a relação da expressão dos colágenos tipos I e III, que modifica as propriedades de força tênsil, rigidez e complacência muscular. Para reorganização do tecido conjuntivo intramuscular, programas de alongamento passivo têm

contribuído para o aumento da extensibilidade muscular, devido à reorganização do tecido conjuntivo intramuscular (COUTINHO *et al.*, 2006).

Ainda em relação às concentrações de colágeno no tecido muscular, sugere-se que a relação entre colágeno tipo I e III é considerada mais importante do que suas concentrações absolutas individuais, onde maior concentração do colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I é considerado favorável, como observado no presente (MATTIELO-SVERZUT *et al.*, 2013). Essa proporção afeta as propriedades mecânicas do músculo, potencializando o desempenho e impedindo lesão das miofibrilas, formando uma estrutura mais favorável para a transmissão das altas cargas (MATTIELO-SVERZUT *et al.*, 2013). Apesar da relação do colágeno III com colágeno I, ter sido significativamente menor no grupo alongamento quando comparado ao grupo controle, verificou-se que dentro do grupo alongamento esta proporção foi expressiva, sugerindo que um dos efeitos agudos do alongamento no músculo idoso, pode ser a prevenção de lesão, por favorecer a mecanotransdução.

O colágeno tipo I é encontrado principalmente no epimísio e em menor quantidade no perimísio, sendo também localizado na pele, ossos, ligamentos e tendões (TAKALA & VIRTANEN, 2000). Suas fibras são as mais tolerantes ao estresse e apresentam alta força tênsil e limitada elasticidade, sendo, portanto, as mais adaptadas para a transmissão de força longitudinal, e é predominante no músculo envelhecido (HAN *et al.*, 1999; MATTIELO-SVERZUT *et al.*, 2013; HINDLE *et al.*, 2009). Do aspecto biomecânico, o colágeno tipo I representa a força tênsil durante a aplicação de uma carga na fase elástica e o colágeno tipo III representa a conformidade tecidual durante ciclo de deformação comprimento-tensão (MATTIELO-SVERZUT *et al.*, 2013). Assim, pode-se justificar os resultados da etapa 1 da presente pesquisa, na qual verificou-se redução da força aplicada para promover o alongamento em ratas idosas. Este achado poderia ser explicado pelo efeito agudo do alongamento, que causou aumento da porcentagem de colágeno III no músculo. Desta forma, durante o ciclo comprimento-tensão ocorre aumento da deformação músculo-tendínea, reduzindo assim a força aplicada para gerar o alongamento.

A transmissão de força do complexo músculo-tendíneo é dependente da integridade estrutural tanto das fibras musculares como da matriz extracelular (MEC)

e sua resistência deve-se a interações inter e intra moleculares, orientação, densidade e comprimento das fibras musculares e das fibras de colágeno (KJAER, 2004). Dessa forma, a quantidade e o tipo de estresse mecânico sobre a MEC podem afetar a síntese e/ou degradação de seus componentes, alterando sua quantidade e qualidade. Nesse aspecto, sabe-se que exercícios com carga são capazes de aumentar a síntese de colágeno muscular (TAKALA e VIRTANEN, 2000). Assim, os achados da presente pesquisa, sugerem que o exercício de alongamento agudo contribuiu para a integridade estrutural da MEC, podendo prevenir lesões e a diminuição da amplitude de movimento em idosos.

De acordo com McCormick (1994), as alterações do diâmetro da fibra muscular estão relacionadas a redução do endomísio, ou seja, o estímulo de alongamento influencia na mecanotransdução, sendo que, as fibras não contráteis (colágenos) são as primeiras a sofrer as adaptações deste estímulo. E ainda, o decréscimo de colágeno III está associado com o aumento da rigidez muscular (McCORMICK, 1994). Assim, os resultados da presente tese sugerem que o alongamento muscular regula positivamente a síntese de colágeno, e auxilia na redução da rigidez muscular no idoso.

Considerando as hipóteses da pesquisa abaixo:

H0) O alongamento muscular agudo não interfere na morfologia, porcentagem de colágeno I e III e TGF $\beta$  -1, e expressão gênica de TGF $\beta$  -1 nas fibras musculares de ratas idosas;

H4) O exercício de alongamento muscular diminui a porcentagem de colágeno I e TGF $\beta$  -1 nas fibras musculares de ratas idosas por análise imunohistoquímica;

H5) O exercício de alongamento muscular aumenta a porcentagem de colágeno III nas fibras musculares de ratas idosas por análise imunohistoquímica;

Os resultados desta etapa da pesquisa rejeitam a H0, pois, o exercício de alongamento proposto interferiu nas porcentagens de colágeno I e III e TGF $\beta$ -1 nas fibras musculares das ratas idosas. Assim, as hipóteses 3 e 4 foram aceitas, uma vez que foi demonstrada redução das porcentagens de colágeno I e TGF $\beta$ -1 e aumento na porcentagem de colágeno III nas fibras musculares das ratas idosas submetidas ao alongamento.

As etapas, 2 e 3, do presente estudo apresentaram algumas limitações como: 1) não foram comparadas ratas idosas e jovens; 2) não houve análise molecular, sendo que a avaliação da expressão de genes relacionados a sarcopenia e hipertrofia iriam contribuir para compreensão dos resultados da morfologia muscular. Assim, realizou-se a análise da expressão de gene relacionado a sarcopenia, na etapa 4, para tentar elucidar os resultados da histomorfometria muscular.



## **MATERIAIS E MÉTODO - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL**

### **3.4.1 Isolamento de RNA total**

Após a dissecação e retirada do músculo sóleo, a porção lateral foi utilizada para extração do RNA total (80mg). Tal porção foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada à  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração do RNA total.

Para a extração do RNA total, o fragmento do músculo sóleo foi submetido à homogeneização com *Trizol* (Gibco) (1mL), seguindo as orientações do fabricante (*Life Technologies, Inc., USA*). Após a homogeneização foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio às amostras, misturado por inversão e incubado por 2 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 min, 12.000 rpm (centrífuga refrigerada, *Eppendorf*). A fase aquosa, que contém o RNA, foi coletada e transferida para outro tubo autoclavado (FIGURA 22A), adicionando-se 0,5mL de álcool isopropílico. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos visando a precipitação do RNA.

Ao final do período de precipitação, as amostras foram centrifugadas por 10 min à 13.000 rpm (centrífuga refrigerada, *Eppendorf*). Em seguida foi realizada a lavagem do RNA precipitado com 1mL de etanol (75%, diluído em água DEPC-*diethyl pytocarbonate* 97%). Após breve agitação, as amostras foram centrifugadas por 5 min à 10.000 rpm, o álcool foi removido (sobrenadante), o RNA foi seco ao ar livre (FIGURA 20B) e posteriormente foi resuspendido em 30mL de tampão TE pH 7,6 (TRIS HCL/EDTA). Para que o *pelet* fosse solubilizado mais facilmente, foi realizada incubação à  $57^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos (Thermomixer- *Eppendorf*).

A absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria (*Nanodrop, Thermo Scientific*), nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. No sentido de avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorbâncias 260 e 280 nm (razão  $\geq 1.8$ ). A absorbância em 280 nanômetros foi utilizada para se determinar o montante de proteínas presentes na amostra. Desta forma, usou-se a razão A260/A280 para determinar a qualidade do procedimento, sendo que os valores entre 1,6 e 2,0 foram considerados adequados.

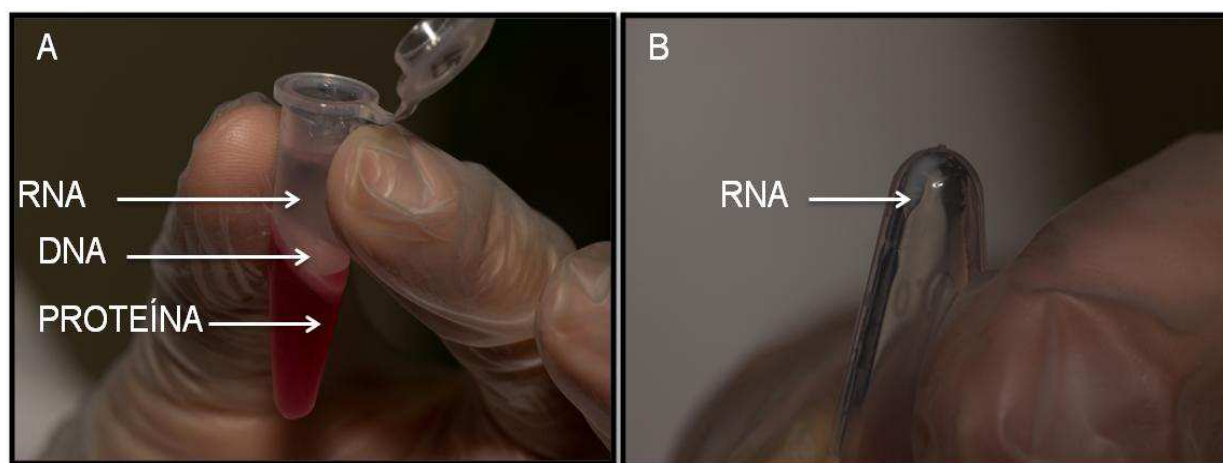


Figura 33 – Etapas de extração do RNA. A – Divisão das fases para purificação da extração (RNA; DNA; Proteínas); B – RNA.

Para avaliar a qualidade do material, foi realizada eletroforese das amostras (25mg de RNA total) em gel denaturante de agarose (1%), formaldeído, em tampão TBE 1x a uma voltagem de 80mV. O gel foi corado com *Safer*. As bandas de RNA ribossomal mais abundantes (28s e 18s) foram visualizadas, indicando que não houve degradação, como pode ser visualizado na Figura 23.

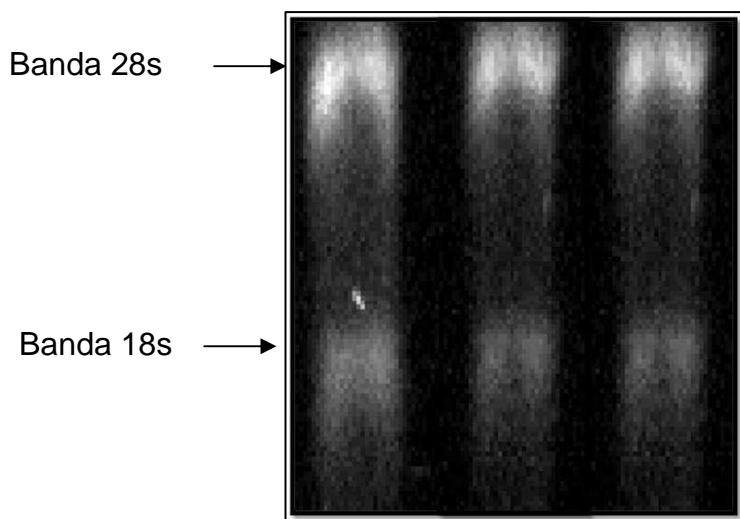


Figura 34 – Gel de agarose (1%) corado com *Safer* indicando a integridade do RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 28s e 18s.

### 3.4.2 Transcrição Reversa (RT):

Após a finalização do isolamento do RNA total, foram realizadas transcrições reversas (RT) em termociclador (*Eppendorf*).

#### Reação de RT (para cada amostra)

- 1ug de RNA total
- 0,02 ug/uL primer oligo dT (*Invitrogen*)

Incubou-se por 10 minutos a 70°C e logo em seguida os tubos foram reservados em gelo, para a adição do *mix*;

#### **Mix:**

- 4mL de 5x Buffer
- 0,8 mM dNTPs (*Invitrogen*)
- 4 mM DTT (*Invitrogen*)
- 200 uL de Transcriptase Reversa (*Invitrogen*)

Após a adição do *mix*, as amostras foram incubadas por 60 min à 42°C e 10 minutos à 94°C, em termociclador (*Eppendorf*).

A integridade do produto da RT DNA complementar (cDNAs) foi conferida através da realização de gel de agarose (1%) não denaturante, corado com *Safer*. Como pode ser visualizado na Figura 24, um padrão de arrastão crescente no gel de agarose.

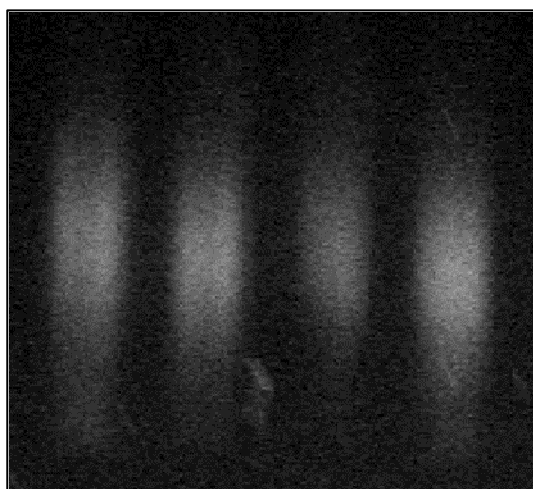


Figura 35 – Gel de agarose (1%) não denaturante, corado com *Safer*, no qual pode ser visualizada a integridade do cDNA, obtido através de reação de transcrição reversa (RT)



### 3.4.3 Primers

Os oligonucleotídeos que foram utilizados como primers para as reações de polimerase em cadeia foram obtidos de HEINEMEIER et al. 2007. As seqüências de cada primer estão representadas na tabela 02. A ressuspensão e concentração para sua utilização foram feitas seguindo as orientações do fabricante, utilizando-se o seguinte cálculo:

$$X (\mu\text{l}) = \frac{\text{volume final } (\mu\text{l}) \times \text{concentração estoque do primer } (\mu\text{M})}{\text{Quantidade de primer (pMol)} / \text{volume ressuspendido } (\mu\text{l})}$$

Tabela 13. Seqüência nucleotídica dos primers para medir a expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.

<i><b>RNA<sub>m</sub></b></i>	<i><b>Senso</b></i>	<i><b>Antisenso</b></i>
<b>TGF-<math>\beta</math>-1a</b>	CCCCTGGAAAGGGCTCAACAC	TCCAACCCAGGTCCTTCCTAAAGTC
<b>GAPDH<sub>a</sub></b>	CCATTCTTCCACCTTTGATGCT	TGTTGCTGTAGCCATATTCATTGT

### 3.4.4 PCR em Tempo Real

As reações em cadeia polimerase (PCR) foram realizadas em um equipamento que monitora a geração de amplicons em tempo real (PCR real-time, *Applied Biosystems*). As reações foram efetuadas utilizando-se 40ng/ $\mu\text{L}$  de cDNA, para todos os genes avaliados, adicionado a uma reação contendo 25 $\mu\text{L}$  de SYBR Green PCR master mix, e 180nM do primer, em uma solução com volume final de 55 $\mu\text{L}$ , dividido em dois tubos (duplicata). Para cada gene, todas as amostras foram amplificadas simultaneamente e em duplicatas. Os dados foram analisados usando o método comparativo do ciclo limiar (Ct). A expressão de cada gene alvo foi normalizada para o gene GAPDH. Além disso, foi utilizado um controle negativo contendo RNA, mas não M-MLV RT, para garantir que o produto do PCR não estava amplificando DNA genômico (SCHWARTZ et al., 1995).

As condições de ciclagem consistiram em 2 passos: 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos com duas etapas, 15s de denaturação à 95°C e 60s de anelamento à 60°C.

Após a reação de PCR, foi possível determinar o início da fase de amplificação exponencial (Ct, *cycle threshold*) de cada amostra, que foi utilizado como dado para a análise da expressão gênica do gene TGFβ-1, como pode ser visualizado na figura 23.

No sistema de amplificação “*Real time*”, as fases de anelamento, extensão e denaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar quando da utilização do termociclador convencional; a diferença é que a amplificação da sequência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluoróforo, que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de *primers*. A quantificação relativa da amplificação é feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho. Neste sistema, em um gráfico hipotético em que a ordenada corresponderia ao número de cópias e a abscissa ao número de ciclos, o resultado teórico esperado é uma curva do tipo sigmóide. O ideal no PCR tradicional é efetuar uma reação em que o número de ciclos escolhido se encontre dentro do trecho linear da curva, evitando-se assim os extremos assintóticos. Pelas características do PCR *real time* é possível determinar este perfil de amplificação, o que representa uma das vantagens metodológicas. O ponto na abscissa correspondente ao início do trecho linear é chamado de Ct e este valor é utilizado para a comparação relativa da expressão gênica: quanto menor o Ct, mais expressa é determinada mensagem (como pode ser visualizado na figura 25), e a especificidade do *primer* poder ser visualizada na figura 26.

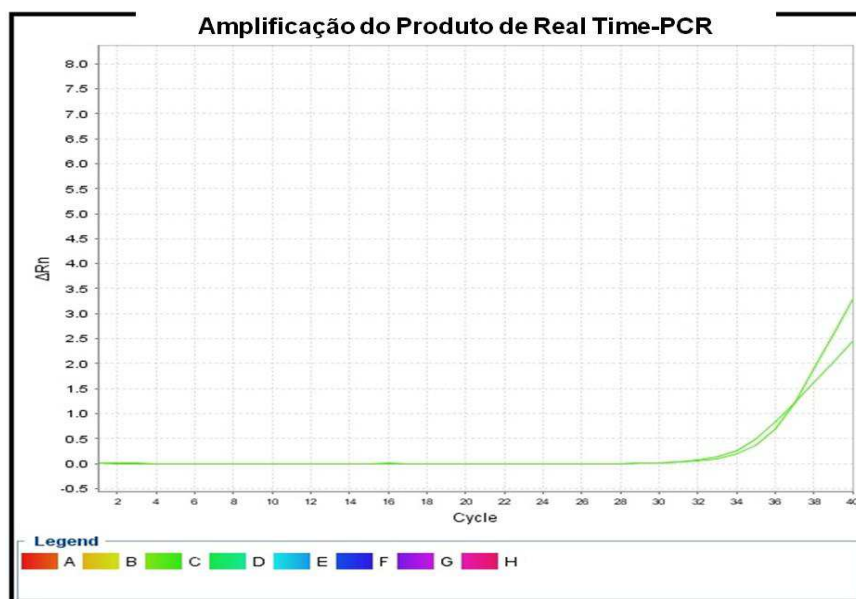


Figura 36- Representação gráfica da amplificação do produto do PCR para determinar a amplificação exponencial ( $C_t$ , *cycle threshold*) do TGF $\beta$ -1, que foi utilizado como dado para a análise da sua expressão gênica.

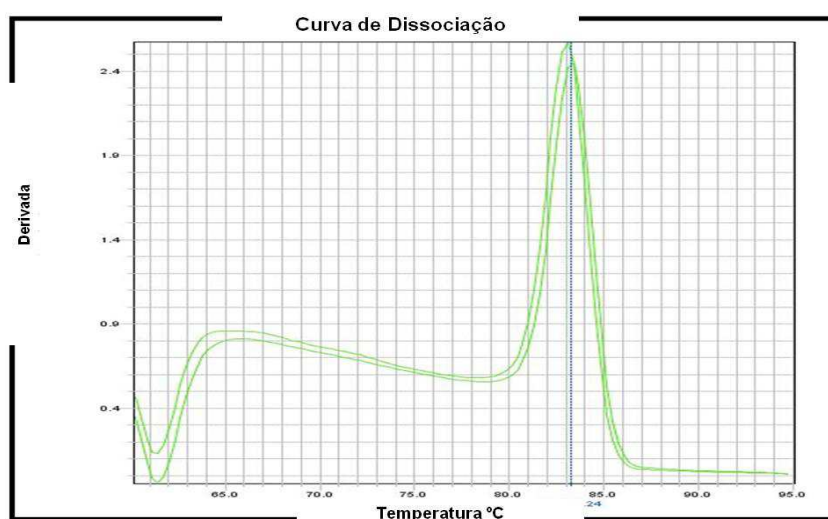


Figura 37- Curva de dissociação demonstrando a especificidade do primer do TGF $\beta$ -1.

### 3.4.5 Análise Estatística

A análise de variância para comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste ANOVA, seguido do *post hoc Tukey*. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ , sempre comparando o grupo controle com o grupo alongamento. Foi considerada como variável dependente a expressão gênica do TGF $\beta$ -1.



## AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL

### 4.4.1 Expressão Gênica de TGF $\beta$ -1

Na análise desta variável os dados apresentaram distribuição normal ( $p=0,32$ , *Shapiro-Wilk*) e homogênea ( $p=0,40$ , *Levene*). As ratas submetidas ao protocolo de alongamento (GA) apresentaram redução significativa na expressão de TGF $\beta$ -1 quando comparada ao grupo de ratas controle ( $p=0,005$ , *ANOVA*, Figura 38).

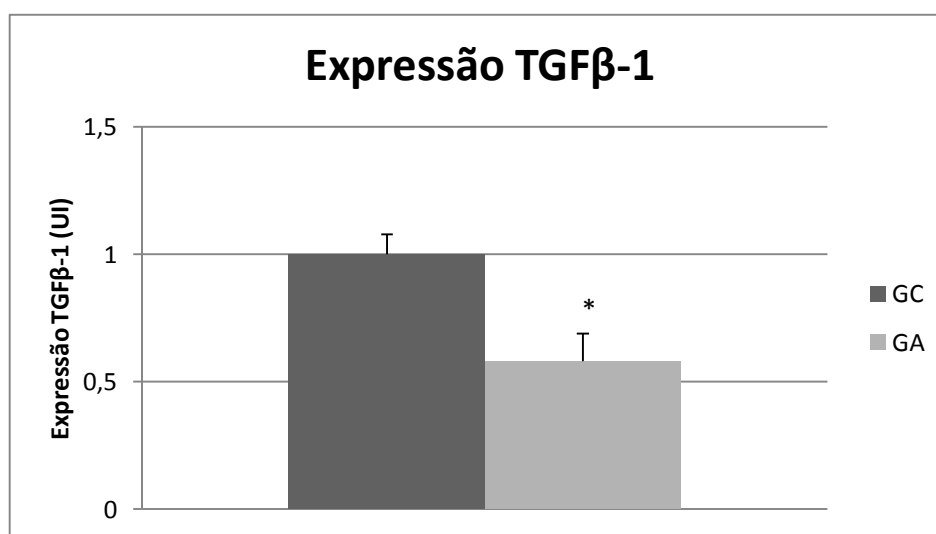


Figura 38 - Efeitos agudos do exercício de alongamento na expressão gênica do TGF $\beta$ -1 do músculo sóleo. \* quando comparado ao GC ( $p=0,005$ , *ANOVA one-way*). Os resultados estão descritos como média $\pm$  desvio-padrão. GC- grupo controle; GA- Grupo alongamento.



## **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL**

A presente etapa envolveu a investigação dos efeitos do protocolo agudo de alongamento em ratas idosas (com 26 meses), conforme descrito no item 4.2, através de análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real do fator de crescimento TGF $\beta$ -1.

Observou-se que o grupo de ratas idosas submetidas ao protocolo de alongamento muscular apresentou expressão gênica do TGF $\beta$ -1 significativamente menor quando comparada com grupo controle. Este resultado concorda com os achados referentes a este fator de crescimento, na avaliação por imunohistoquímica.

Cabe ressaltar que durante o processo de envelhecimento, a expressão gênica basal TGF $\beta$  está aumentada, fato que, potencializa a deposição de colágeno e tecido fibrótico no músculo (LI *et al.*, 2013). Neste sentido, na presente pesquisa observou-se expressão gênica de TGF $\beta$ -1 nos dois grupos de ratas idosas, assim, sustenta-se a premissa que o músculo idoso é inflamado crônico, entretanto, no grupo submetido ao alongamento muscular a expressão foi significativamente menor, sugerindo que o exercício de alongamento atua como inibidor da expressão gênica de TGF $\beta$ -1.

Estudos verificaram que a presença de TGF $\beta$ -1 intracelular tem impacto negativo na regeneração muscular, enquanto que em células musculares híbridas, ele está ausente (YAMAZAKI, 1994; MU e LI., 2011), o que suporta a afirmativa de que o exercício de alongamento muscular realizado em ratas idosas possui ação antifibrótica.

Em estudos anteriores (BERNASCONI *et al.*, 1999; CONFALONIERI *et al.*, 1997), utilizando amostras de biopsia muscular de pacientes com doenças musculares, o TGF $\beta$ -1 foi localizado, em áreas de espessamento tecidual na matriz extracelular ou no tecido conjuntivo fibroso. Estes pesquisadores revelaram que o TGF $\beta$ -1 desempenha importante papel nos processos de fibrose tecidual associados a doenças musculoesqueléticas como distrofia muscular progressiva e polimiosite (BERNASCONI *et al.*, 1999; CONFALONIERI *et al.*, 1997). Além disso, foi demonstrado em experimento realizado no diafragma de camundongos com distrofia

muscular que o RNAm do TGF $\beta$ -1 localiza-se em áreas de infiltração de células inflamatórias (GOSSELIN *et al.*, 2004).

Smith e colaboradores (2007) verificaram que o músculo lesionado submetido ao alongamento muscular associado a contração tetânica, diminui a expressão gênica do TGF $\beta$ -1, o que induz a decréscimo na deposição de tecido fibrótico no músculo, estimulando a recuperação da funcionalidade muscular, o que concorda com os achados do presente estudo. Ainda, Wipff e colaboradores (2007), realizaram alongamento de miofibroblastos e verificaram que a expressão de TGF $\beta$ -1 reduziu de acordo com o aumento da intensidade do alongamento. Dessa forma, os parâmetros de prescrição de exercício de alongamento utilizados na presente pesquisa foram suficientes para reduzir a expressão de TGF $\beta$ -1 em ratas idosas.

Suetta e colaboradores (2013) analisaram por biópsia muscular o comportamento da miostatina no músculo imobilizado de idosos e jovens humanos, e constataram que a expressão de miostatina foi significativamente maior no músculo idoso imobilizado quando comparado ao jovem. Considerando que a via de sinalização de TGF $\beta$ -1 e miostatina é a mesma, a maior expressão de TGF $\beta$ -1 estimula a sarcopenia, assim, apesar dos resultados da presente pesquisa terem indicado atrofia muscular (na análise histomorfométrica), a análise da expressão gênica do TGF $\beta$ -1 aponta que o exercício de alongamento muscular previne a sarcopenia e tem ação anti-fibrótica em nível molecular. Porém, análise da quantidade de proteína poderia confirmar estas hipóteses.

Considerando as hipóteses da pesquisa:

H0) O alongamento muscular agudo não interfere na morfologia, porcentagem de colágeno I e III e TGF $\beta$  -1, e expressão gênica de TGF $\beta$  -1 nas fibras musculares de ratas idosas;

H6) O exercício de alongamento muscular agudo diminui a expressão gênica do TGF $\beta$ -1 nas fibras musculares de ratas idosas;

A etapa de avaliação da expressão gênica do TGF $\beta$ -1 demonstrou que o alongamento utilizado interferiu no comportamento da expressão gênica do TGF $\beta$ -1, dessa forma, a H0 foi rejeitada e a H6 foi aceita, uma vez que o exercício de



alongamento atuou como modulador da atividade do TGF $\beta$ -1, reduzindo sua expressão gênica.

Esta etapa da pesquisa apresentou as seguintes limitações: 1) ausência de análise de mais genes relacionados a sarcopenia ou hipertrofia muscular; 2) não comparação entre ratas jovens e idosas; 3) falta de análise dos efeitos crônicos do protocolo de alongamento muscular.

Sendo assim, sugere-se para estudos futuros a investigação dos efeitos morfológicos e moleculares crônicos do protocolo de alongamento utilizado em ratas idosas.



## 6. CONCLUSÕES

- O aparato de alongamento desenvolvido nesta pesquisa pode ser utilizado em estudos experimentais, permitindo o monitoramento da força muscular, o que contribui para padronizar o modo de promover o exercício de alongamento muscular em ratos.
- Ratas idosas necessitam de menor força de aplicação para induzir o alongamento do músculo sóleo, o que pode ser causado pelo processo de envelhecimento que leva a declínio no torque passivo.
- Não houve alteração da massa corporal e massa do músculo sóleo das ratas idosas, demonstrando que a randomização dos grupos foi adequada.

O exercício de alongamento muscular agudo:

- não promoveu aumento do comprimento do músculo sóleo esquerdo em ratas idosas;
- não induziu sarcomerogênese, que justifica a ausência de aumento do comprimento do músculo sóleo;
- promoveu hipotrofia do músculo sóleo esquerdo, fato que pode ser causado pela adaptação do músculo esquelético ao estímulo agudo do alongamento;
- parece favorecer a mecanotransdução e ter ação antifibrótica.

## 7. APOIO FINANCEIRO

Universidade Federal do Paraná; Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq, Processos 474303/2011-0 e 308696/2012-3); Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR); Bolsa REUNI (CAPES); PNPd (nº: 23038.039396/2008-19)

## 8. APOIO TÉCNICO

Ana Paula Camargo Martins (PUCPR), Marina Luise Viola de Azevedo (PUCPR), Rafael Zott (PUCPR), Luiz Guilherme Achcar Capriglione (PUCPR), Hilana Rickli Fiuza Martins (mestranda PPGEDF–UFPR), Marcos Martins (mestrando PPGEDF–UFPR).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA DR, BERTONCELLO D, CARVALHO LC. Avaliação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas imobilizado e submetido à corrente russa. *Fisioterapia e Pesquisa*, São Paulo. 2009;16(1):59-64.

ACSM (GARBER CE, BLISSMER B, DESCHENES MR, FRANKLIN BA, LAMONTE MJ, LEE IM, NIEMAN DC, SWAIN DP). Quantity and Quality of Exercise for Developing and Maintaining Cardiorespiratory, Musculoskeletal, and Neuromotor Fitness in Apparently Healthy Adults: Guidance for Prescribing Exercise, **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 2011;43(7): 1334-1359.

ALLEN RE, BOXHORN LK. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. **Journal of Cellular Physiology**, 1989, vol. 138, no. 2, pp. 311–315.

ALNAQEEB MA, AL ZAID NS, GOLDSPINK G. Connective tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle. **J Anat**, 1984: 139 (Pt 4): 677–689.

ARCHAMBAULT JM, HART DA, HERZOGW(. Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading.; **Connect Tissue Res**. 2001; 42, 13–23.

ANDREOLLO NA, SANTOS EF, ARAÚJO MR, LOPES LR. Rat's age versus Human's age: what is the relationship?. **ABCD Arq Bras Cir Dig**. 2012; 25(1): 49-51.

AHTIKOSKI AM, KOSKINEN SO, VIRTANEN P, KOVANEN V, RISTELI J, TAKALA TE. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**, 2003; 177: 473-481.

AOKI, M. S., SOARES, A. G; MIYABARA, E. H., BAPTISTA, I.; MORISCOT, A. Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth. **Muscle Nerve**, 2009; 40: 992–999.

BALCOMBE,JP.;BARNARD,ND.;SANDUSKY,C. Laboratory Routines Cause Animal Stress. **Contemporary Topics by the American Association for Laboratory Animal Science**. 2004;43 (6): 42-51.

BALLAK SB, DEGENS H, de HAAN A, JASPERS RT. Aging related changes in determinants of muscle force generating capacity: a comparison of muscle aging in men and male rodents. **Ageing Res Rev**. 2014; 14:43-55.

BAYLEI A. Molecular mechanism of ageing in connective tissues. **Mechan Ageing Develop**. 2001; 122:735-755.

BARANDA PS, AYALA F. Chronic flexibility improvement after 12 week of stretching program utilizing the ACSM recommendations: Hamstring Flexibility. **International Journal of Sports Medicine**, 2010; 31(6):389-96.

BARBOSA AR, SOUZA JMP,LEBRÃO ML, LAURENTI R, MARUCCI MFN. Functional limitations of Brazilian elderly by age and gender differences:data from SABE Survey. **Cad. Saúde Pública**, 2005;21(4):1177-1185.

BANDY WD, IRION JM, BRIGGLER M. The effect of time and frequency of static stretching on flexibility of the hamstring muscles. *Phys Ther*,1997; 77(10):1090-6.

BATISTA LH, VILAR AC, DE ALMEIDA FERREIRA JJ, REBELATTO JR, SALVINI TF. Active stretching improves flexibility, joint torque, and functional mobility in older women. **Am J Phys Med Rehabil**, 2009; 88(10):815-22.

BAPTISTA RR, SCHEEREN EM, MACINTOSH BR & VAZ MA Low-frequency fatigue at maximal and submaximal muscle contractions. **Braz J Med Biol Res**, 2009; 42: 380-5.

BEAN C, FACCHINELLO N, FAULKNER G, LANFRANCHI G. The effects of Ankrd2 alteration indicate its involvement in cell cycle regulation during muscle differentiation. **Bioch et Biophys Acta**, 2008; 1023-1035.

BERNASCONI P, TORCHIANA E, CONFALONIERI P, BRUGNONI R, BARRESI R, MORA M, CORNELIO F, MORANDI L, MANTEGAZZA R. Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. **J Clin Invest**, 1995; 96: 1137–1144.

BEST, T. M.; MCELHANEY, J.; GARRET, W. E. J.R. and MYERS, B. S. Characterization of the passive responses of live skeletal muscle using quasi-linear theory of viscoelasticity. **J. Biomech**, 1994; 27: 413-419,

BIRBRAIR A, ZHANG T, ZHONG-MIN W, MESSI ML. Type-1 pericytes participate in fibrous tissue deposition in aged skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, 2013; 305 (11): 1098-113.

BIRD ML, HILL K, BALL M, WILLIAMS AD. Effects of resistance- and flexibility-exercise interventions on balance and related measures in older adults. **J Aging Phys Act**, 2009;17(4):444-54.

BOUFFARD, N. A.; CUTRONEO, K.R.; BADGER, G.J.; WHITE, S.L; BUTTOLPH, T.R.; EHRLICH, H.P; TUTTLE, D. S.; LANGEVIN, H. M. Tissue Stretch Decreases Soluble TGF- $\beta$ 1 and Type-1 Procollagen in Mouse Subcutaneous Connective Tissue: Evidence From Ex Vivo and In Vivo Models. **J Cell Physiol**, 2008; 214(2): 389–395.

BORG TK, CAULFIELD JB. Morphology of connective tissue in skeletal muscle. **Tissue Cell**, 1980: 12: 197–207.

BLOCH RJ, GONZALES-SERRATOS H. Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle. **Exerc Sport Sci Rev**, 2003: 31: 73–78.

BLOUGH ER, LINDERMAN JK. Lack of skeletal muscle hypertrophy in very aged male Fischer 344 x Brown Norway rats. **J Appl Physiol**, 2000;4:1265–1270.

BURKE TN, FRANÇA FJ, MENESES SR, PEREIRA RM, MARQUES AP. Postural Control In Elderly Women With Osteoporosis: comparison of balance, strengthening and stretching exercises. A randomized controlled trial. **Clin Rehabil**, 2012; 26(11): 1021-31.

BURKS, T.N; COHN, R.D. Role of TGF-  $\beta$  signaling in inherited and acquired myopathies. **Skeletal Muscle**, 2011; 1:19.

BURKHOLDER TJ. Mechanotransduction in skeletal muscle. **Front Biosci**, 2008; 12:174-191.

CAÇÃO-BENEDINI LO, RIBEIRO PG, PRADO CM, CHESCA DL, MATTIELLO-SVERZUT AC. Immobilization and therapeutic passive stretching generate thickening and increase the expression of laminin and dystrophin in skeletal muscle. **Braz. J Med Biol Res**, 2014; 47(6): 483-491

CAÇÃO-BENEDINI LO, RIBEIRO PG, GOMES ARS, YWAZAKI JL, MONTE-RASO VV, PRADO CM, MATTIELLO-SVERZUT AC. Remobilization through stretching improves gait recovery in rat. **Acta Histochemica**, 2013; 115:460-469.

CALDOW MK, CAMERON-SMITH D, LEVINGER P, McKENNA MJ, LEVINGER I. Inflammatory markers in skeletal muscle of older adults. **Eur J Appl Physiol**, 2012;

CARLSON ME, SUETTA C, CONBOY MJ, AAGAARD P, MACKEY A, KJAER M, CONBOY I. Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. **EMBO Mol Med**, 2009; 1: 381–391.

CALVI, E.N.C; NAHAS, F. X; BARBOSA, M.V.; CALIL, J.A.; IHARA, S. S. M; SILVA, M. S; FRANCO, M.F.; FERREIRA, L.M. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 2012; 27 (10) : 681.

CAIOZZO VJ, UTKAN A, CHOU R, KHALAFI A, CHANDRA H, BAKER M, ROURKE B, ADAMS G, BALDWIN K, GREEN S. Effects of distraction on muscle length: mechanisms involved in sarcomerogenesis. **Clin Orthop Relat Res** Oct, 2002; (403 Suppl):S133-45. Review.

CASTRO EA, LIMA LM, CERQUEIRA MS, GOBBI S, DOIMO LA. Sarcopenia and cardiovascular risk in physically active adult and elderly women. **Motri**, 2014; 20(1): 92-99.

CASTRO-FERREIRA R, CARVALHO RF, PIRES IF, MOREIRA AFL. Papel da titina na modulação da função cardíaca e suas implicações fisiopatológicas. **Arq. Bras Cardiol**, 2011; 96 (4): 332-339.



CARMELI E., MOAS M., LENNON S., POWERS SK. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. **Exp Physiol**, 2005; 90: 613-619.

CARREGARO RL, SILVA LCCB, GIL COURY HJC. Comparação entre dois testes clinicos para avaliar a flexibilidade dos músculos posteriores da coxa. **Rev Bras Fisioter**, 2007;11(2):139-145.

CARNAC, G.; PRIMIG, M.; KITZMANN, M.; CHAFEY, P.; TUIL, D.; LAMB, N.; and FERNANDEZ, A. RhoA GTPase and serum response factor control selectively the expression of myo-D without affecting myf-5 in mouse myoblasts. **Mol. Biol. Cell**, 1998; 9: 1891-1902.

CARVALHO JAM, RODRÍGUEZ-WONG LL. A transição da estrutura etária da população brasileira na primeira metade do século XXI. **Cadernos de Saúde Pública**, 2008; 24 (3):597-605.

CARSON, J. A. & WEI, LEI. Integrin signaling's potencial for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. **J. Appl. Physiol**, 2000; 88:337-343,.

CARSON, J. A. & BOOTH, F. W. Effect of serum and mechanical stretch on skeletal a-actin gene regulation in cultured primary muscle cells. **Am. J. Physiol**, 1998; 275: C1438-1448,.

CARSON, J. A.; SCHWARTZ, R.J .and BOOTH, F.W.. SRF and TEF-1 control of chicken skeletal a-actin gene during slow-muscle hypertrophy. **Am. J. Physiol**, 1996; 270:C1624-1633,.

CARTER CS, HOFER T, SEO AT, LEEUWENBURGH C. Molecular mechanisms of life- and health-span extension: Role of calorie restriction and exercise intervention. **Appl. Physiol. Nutr. Metab**, 2007;32: 954-966.

CARTER EE, TOMAS MM, MURYNKA T, ROWAN SL, WRIGHT KJ, HUBA E, HEPPLER RT.. Slow twitch soleus muscle in not protect from sarcopenia in senescent rats. **Experim Gerontol**. 2010; 45: 662-670

CASEROTTI P. Strength Training in Older Adults: Changes in Mechanical Muscle Function And Functional Performance. **The Open Sports Sciences Journal**, 2010; 3:62-66.

CASSILHAS RC, REIS IT, VENANCIO D, FERNANDES J, TUFIK S, MELLO MT. Animal model for progressive resistance exercise: a detailed description of model and its implications for basic research in exercise. **Motriz**, 2013;19 (1): 178-184.

CEGLIA L, NIRAMITMAHAPANYA S, PRICE LL, HARRIS SS, FIELDING RA, DAWSON-HUGHES B. An evaluation of the reliability of muscle fiber cross-sectional area and fiber numbers of measurements in rat skeletal muscle. **Biol. Proc. Online**, 2013; 15:6

CLARK, E. A. & BRUGGE, J. S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. **Science**, 1995; 268: 233-239,.

CLARK HD, WELLS GA, HUËT C, MCALISTER FA, SALMI LR, FERGUSON D, *et al.* Assessing the quality of randomized trials: reliability of the Jadad scale. **Control Clin Trials**, 1999; 20(5):448-52.

CLARK BC, MANINI TM. Sarcopenia  $\neq$  dynapenia. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, 2008;63(8): 829-834.

CODARIN GF, FELICIO LR, COELHO DM, OLIVEIRA AS. Analysis of angular reading distortions of photographic images. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, 2012; 16(4):309-313.

COOPER, R.; MISHRA, G.; CLENNELL, S.; GURALNIK, J.; KUH, D. Menopausal status and physical performance in midlife: findings from a British birth cohort study. **Menopause**, 15:1079–1085, 2008.

CONFALONIERI P, BERNASCONI P, CORNELIO F, MANTEGAZZA R. Transforming growth factor-beta 1 in polymyositis and dermatomyositis correlates with fibrosis but not with mononuclear cell infiltrate. **J Neuropathol Exp Neurol**, 1997; 56: 479–484.

COSTA TC, LOCKS RR, KOPPE S, YAMAGUTI AM, FORMIGA A, GOMES ARS. Strength And Stretching Training And Detraining On Flexibility Of Elderly. **Topics in Geriatric Rehabilitation**, 2013;29: 142-148.

COUTINHO EL, De LUCA C, SALVINI TF, VIDAL BC.; Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. **Connect Tissue Res**, 2006; 47 (5):278-286.

COUTINHO EL, GOMES ARS, FRANÇA CN, OISHI J, SALVINI TF. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 2004; 37: 1853-1861.

COHN RD, VAN ERP C, HABASHI JP, SOLEIMANI AA, KLEIN EC, LISI MT, GAMRADT M, AP RHYS CM, HOLM TM, LOEYS BL, RAMIREZ F, JUDGE DP, WARD CW, DIETZ HC. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. **Nat Med**, 2007; 13: 204–210.

COHEN J. *Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2<sup>nd</sup> ed. 1988.

COHEN S, BRAULT JJ, GYGI SP, GLASS DJ, VALENZUELA DM, GARTNER C, *et al.* During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. **J Cell Biol**, 2009;185(6):1083-95.

CONDON SM & HUTTON RS. Soleus muscle electromyographic activity and ankle dorsiflexion range of motion during four stretching procedures. **Phys Ther**, 1987; 67: 24-30.

CONTE E , FRUCIANO M , FAGONE E , GILI E , CARACI F , IEMMOLO M , CRIMIN , VANCHERI C . Inhibition of PI3K prevents the proliferation and differentiation of human lung fibroblasts into myofibroblasts: the role of class I P110 isoforms . **PLoS One**, 2011 ; 6 : 246-63.

CHRISTIANSEN CL. The effects of hip and ankle stretching on gait function of older people. **Arch Phys Med Rehabil**, 2008;89(8):1421-8.

CRISTOPOLISKI F, SARRAF TA, DEZAN VH, PROVENSI CLG, RODACKI ALF. Transient effect of flexibility exercises in the hip joint on the gait of older women. Efeito transiente de exercícios de flexibilidade na articulação do quadril sobre a marcha de idosos. **Rev Bras de Med do Esporte**, 2008; 14: 139-44.

CRISTOPOLISKI F, BARELA JA, LEITE N, FOWLER NE, RODACKI AL, *et al.* Stretching exercise program improves gait in the elderly. **Gerontology**, 2009;55(6): 614-20.

CUTLIP RG, STAUBER WT, WILLISON RH, McINTOSH TA, MEANS KH. Dynamometer for rat plantar flexor muscles in vivo. **Medical & Biological Engineering & Computing**, 1997; 35: 540-543.

DE DEYNE PG. Application of passive stretch and its implications for muscle fibers. **Phys Ther**, 2001;81:819–827.

DI COLA E, WAIGH TA, TRINICK J, TSKHOVREBOVA L, HOUMEIDA A, PYCHOUT-HINTZEN W, DEWHURST C. Persistence length of titin from rabbit skeletal muscles measured with scattering and microrheology techniques. **Bioph J**, 2005; 88: 4095-4106.

DIONNE, I.J.; KINAMAN, K.A.; POEHLMAN, E.T. Sarcopenia and muscle function during menopause and hormone-replacement therapy. **J Nutr Health Aging**, 2000; 4: 156–161.

DOEBELIN EO. **Measurement Systems: Application and Design**. 5ª edição, McGraw-Hill Education, 2004.

DOHERTY, T.J. Ageing and Sarcopenia. **J Appl Physiol**, 2003; 96: 1717-1727.

DUCOMPS C, MAURIÈGE P, DARCHE B, COMBES S, LEBAS F, DOUTRELOUXS JP. Effects of jump training on passive mechanical stress and stiffness in rabbit skeletal muscle: role of collagen. **Acta Physiol Scand**, 2003; 178: 215-224.

DUNCAN MR, FRAZIER KS, ABRAMSON S, WILLIAMS S, KLAPPER H, HUANG X, GROTHENDORST GR. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor  $\beta$ -induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. **FASEB J**. 1999; 13: 1774–1786.

FAULKNER, J.A., LARKIN, L.M., *et al.*, Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**, 2007; 34 (11), 1091–1096.

FATOUROS, I.G.; KAMBAS, A.; KATRABASAS, I.; LEONTSINI, D.;CHATZINIKOLAOU, A.; JAMURTAS, A.Z. Resistance training and detraining effects on flexibility performance in the elderly are Intensity-dependent. **J Strength Cond Res**, 2006; 20(3): 634-2.

FELAND JB, MYRER JW, MERRILL RM. Acute changes in hamstring flexibility: PNF versus static stretch in senior athletes. **Phys Ther in Sport**, 2001; 2:186-193.

FELAND JB, MYRER JW, SCHULTHIES SS, FELLINGHAM GW, MEASOM GW. The effect of duration of stretching of the hamstring muscle group for increasing range of motion in people aged 65 years or older. **Phys Ther**, 2001;81(5):1110-7.

FERBER R, OSTERNIG L, GRAVELLE D. Effect of PNF stretch techniques on knee flexor muscle EMG activity in older adults. **J Electromyogr Kinesiol**,2002;12(5): 391-7.

FERREIRA GN, TEIXEIRA-SALMELA LF, GUIMARÃES CQ. Gains in flexibility related to measures of muscular performance: impact of flexibility on muscular performance. **Clin J Sport Med**,2007;17(4):276-8.

FIELDING RA, VELLAS B, EVANS WJ,BHASIN S,MORLEY JE, NEWMAN AB, ABELLAN van KAN G, ANDRIEU S,BAUER J, BREUILLE D, CEDERHOLM T, CHANDLER J, DE MEYNARD C, DONINI L, HARRIS T, KANNT A, KEIME GUIBERT F, ONDER G, PAPANICOLAOU D, ROLLAND Y, ROOKS D, SIEBER C, SOUHAMI E, VERLAAN S, ZAMBONI M.. Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences.International working group on sarcopenia. **J. Am. Med. Dir. Assoc.**2011; 12 (4),249–256.

FLUCK, M. J. A.; CARSON, S. E.; GORDAN, A.; ZIEMIECKI and BOOTH, F. W. Focal adhesion proteins FAK and paxilin increase in the hypertrophied skeletal muscle. **Am. J. Physiol**, 1999;277: C152-C162,.

FOWLES JR, MacDOUGAL JD, TARNOPOLSKY MA, SALE DG, ROY BD, YARASHESKI KE. The effects of acute passive stretch on muscle protein synthesis in humans. **Can J Appl Physiol**, 2000; 25(3): 165-180.

FRONTERA WR, REID KF, PHILLIPS EM, KRIVICKAS LS, HUGHES VA, ROUBENOFF R, FIELDING RA. Muscle fiber size and function in elderly humans: a longitudinal study. **J Appl Physiol**, 2008;105:637-642.

GAJDOSIK, R.L.; LINDEN, D.W.V.; WILLIAMS, A.K. Influence of age on length and passive elastic stiffness characteristics of the calf muscletendon unit of women.**Phys. Ther**, 79(9):827-838, 1999.

GAJDOSIK, R,L. Passive extensibility of skeletal muscle: review of the literature with clinical implications. **Clin Biomech**, 2001; 16: 87-101.

GAJDOSIK RL, VANDER LINDEN DW, MCNAIR PJ, RIGGIN TJ, ALBERTSON JS, MATTICK DJC, *et al*. Slow passive stretch and release characteristics of the calf

muscles of older women with limited dorsiflexion range of motion. **Clin Biomech (Bristol, Avon)**, 2004;19(4):398-406.

GAJDOSIK RL, VANDER LINDEN DW, MCNAIR PJ, WILLIAMS AK, RIGGIN TJ. Effects of an eight-week stretching program on the passive-elastic properties and function of the calf muscles of older women. **Clin Biomech (Bristol, Avon)**, 2005;20(9): 973-83.

GALLO LH, GONÇALVES R, GURJÃO ALD, PRADO AKG, CECCATO MJ, JAMBASSI FILHO C, GOBBI S. Effect of different stretching volumes on functional capacity in elderly women. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, 2013;15(1):103-112.

GALLON D, RODACKI AL, HERNANDEZ SG, DRABOVSKI B, OUTI T, BITTENCOURT LR, et al. The effects of stretching on the flexibility, muscle performance and functionality of institutionalized older women. **Braz J Med Biol Res**, 2011;44(3):229-35.

GARBER CE, BLISSMER B, DESCHENES MR, FRANKLIN BA, LAMONTE MJ, LEE IM, et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc**, 2011;43(7):1334-59.

GAO,Y.; KOSTROMINOVA,T.Y.; FAULKNER, J.A.; WINEMAN, A.S. Age-related changes in the mechanical properties of the epimysium in skeletal muscles of rats. **J Biomech**, 2008; 41: 465–469.

GAVIN TP, WAGNER PD . Effect of short-term exercise training on angiogenic growth factor gene responses in rats. **J Appl Physiol**. 2001; 90, 1219–1226.

GILLIES, A. R; LIEBER, R.L. Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. **Muscle Nerve**. 2011; 44(3): 318–331.

GOLDSPINK, G.; SCUTT, A.; LOUGHNA, P.T.; WELLS, D. J.; JAENCKE, T.;GERLACH, G. F. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. **Am J Physiol**, 1992; 22: R356-R363.

GOLDSPINK, G. Molecular mechanism involved in the determination of muscle fiber mass and phenotype. **Adv Exerc Sports Physiol**, 1999;5(2): 27-39.

GOLDSPINK, G; HARRIDGE, S. Cellular and molecular aspects of adaptation in skeletal muscle. In: *Strength and Power in Sport*. Komi, PV, ed. Malden, MA:**Blackwell Science Inc**, 2003; 231–251.

GOLDSPINK G. Sarcomere length during post natal growth of mammalian muscle fibres. **J. Cell Sci**, 1968; 3: 539-548.

GOLDSPINK G, FERNANDES K, WILLIAMS PE, WELLS DJ. Age-related changes in collagen gene expression in the muscles of mdx dystrophic and normal mice. **Neuromuscul Disord**, 1994; 4: 183–191.

GOMES ARS, COUTINHO EL, FRANÇA CN, POLÔNIO J, SALVINI TF. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2004; 37: 1473-148.

GOMES AR, SOARES AG, PEVIANI S, NASCIMENTO RB, MORISCOT AS, SALVINI TF. The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin, and atrogen-1 gene expressions. **Arch Phys Med Rehabil**, 2006;87(2):241-246.

GOMES AR, CORNACHIONE A, SALVINI TF, MATTIELLO-SVERZUT AC. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. **J Anat.**, 2007;210(3):328-35.

GOMES ARS, WISCHNESKI P, ROX R. Whether or not to affiliate stretching with resistance training to improve equilibrium in the elderly. **Act Fisiatr**, 2011;18(3):130-135.

GOSSELIN, L.E.; ADAMS, C.; COTTER, T.A.; MCCORMICK, R.J.; THOMAS, D.P. Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: role of extracellular matrix. **J. Appl. Physiol**, 1998; 85(3): 1011–1016.

GORDON AM, HUXLEY AF, JULIAN FJ. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibers. **The Journal of Physiology**, 1966; 184:170-192.

GUCCIONE, A.A. **Fisioterapia Geriátrica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.

GUO X, WANG XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. **Cell Res**, 2009; 19:71-88.

GURJÃO AL, GONÇALVES R, DE MOURA RF, GOBBI S. Acute effect of static stretching on rate of force development and maximal voluntary contraction in older women. **J Strength Cond Res**, 2009; 23(7):2149-54.

GUSMÃO CVB, BELANGERO WD. How do bone cells sense mechanical loading. **Rev Bras Ortop**. 2009; 44 (4):299-305.

HAMADA K, VANNIER E, SACHECK JM, WITSELL AL, ROUBENOFF R. Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. **FASEB J**, 2005; 19: 264–266.

HARJOLA, V. P.; JANKALA, H.; HARKONEN, M. Myosin heavy chain mRNA and protein distribution in immobilized rat skeletal muscle are not affected by testosterone status. **Acta Physiol Scand**, 2000;169: 277-282.

HAAS, K. M.; BERNDT, A.; STILLER, K. J.; HYCKEL, P.; KOSMEHL, H. A comparative quantitative analysis of laminin-5 in the basement membrane of normal,

hyperplastic, and malignant oral mucosa by confocal immunofluorescence imaging. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 2001;49(10):1261-68.

HADDAD F, GREGORY RA. Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. **J Appl Physiol**, 2006; 100: 1188 – 1203.

HAUS JM, CARRITHERS JA, TRAPPE SW, TRAPPE TA.. Collagen, Cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, 2007; 103: 2068-2076.

HAN XY, WANG W, KOMULAINEN J, KOSKINEN SO, KOVANEN V, VIHKO V, TRACKMAN PC, TAKALA TE. Increased mRNAs for procollagens and key regulating enzymes in rat skeletal muscle following downhill running. **Pflugers Arch**, 1999; 437(6):857-64.

HALL DT, Ma JF, MARCO SD, GALLOUZI I-E. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in muscle wasting syndrome, sarcopenia and cachexia. **Aging**, 2011;3(8):1-14.

HALLEGRAEFF JM, VAN DER SCHANS CP, DE RUITER R, DE GREEF MH. Stretching before sleep reduces the frequency and severity of nocturnal leg cramps in older adults: a randomised trial. **J Physiother**, 2012;58(1):17-22.

HEINEMEIER K, LANGBERG H, OLESEN JL, KJAER M. Role of TGF- $\beta$ 1 in relation to exercise-induced type I collagen synthesis in human tendinous tissue. **J Appl Physiol**, 2003; 95:2390–2397.

HEINEMEIER KM, OLESEN JL, HADDAD F, LANGBERG H, KJAER M, BALDWIN KM, SCHJERLING P. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. **J Physiol**, 2007;582: 1303–1316.

HEINEMEIER KM, OLESEN JL, SCHJERLING P, HADDAD F, LANGBERG H, BALDWIN KM, KJAER M. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. **J Appl Physiol**, 2007; 102: 573–581.

HWANG JH, RA Y, LEE KM, LEE JY, GHIL SH. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. **Arch Phys Med Rehabil**, 2006;87(1):20-6.

HWEE DT, BODINE SC. Age-related deficit in load –induced skeletal muscle growth. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 2009; 6:618-628.

HINDLE AG, HORNING M, MELLISH JA, LAWLER JM. Diving into old age: muscular senescence in a large-bodied , long-lived mammal, the Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*). **J Exp Biol**, 2009; 212: 790-796.

HOLLAND GJ, TANAKA K, SHIGEMATSU R, NAKAGAICHI M. Flexibility and physical functions of older adults: A Review. **Aging and Physical Activity**, 2002;10:169-206.

HOLLOSZY JO, CHEN M, CARTEE GD, YOUNG JC. Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. **Mech Ageing Dev**, 1991; 60(2):199-213.

HOWARD C, FERRUCCI L, SUN K, FRIED LP, WALSTON J, VARADHAN R, GURALNIK JM, SEMBA RD. Oxidative protein damage is associated with poor grip strength among older women living in the community. **J. Appl. Physiol**, 2007; 103: 17-20.

HOSHIJIMA, M.; SAH, V. P.; WANG, Y.; CHIEN, K. R. and BROWN, J. H. The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes: involvement of Rho kinase. **J. Biol. Chem**, 1998; 273: 7725-7739,.

HUIJING PA. Muscle as a collagen fiber reinforced composite: a review of force transmission in muscle and whole limb. **J Biomech**, 1999: 32: 329–345.

IBGE. Estimativas de projeção da população. **Projeções 1980-2060**. 2010.

IKEDA S, YOSHIDA A., MATAYOSHI S., TANAKA N. Repetitive stretch induces c-fos and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. **Arch Phys Med and Rehabil**, 2003; 84(3): 419–423.

IKEDA S, YOSHIDA AS, MATAYOSHI, HORINOUCHE K, TANAKA N. Induction of myogenin messenger ribonucleic acid in rat skeletal muscle after 1 hour of passive repetitive stretching. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, 2004;85, (1):166–167,.

IKEDA S, KAMIKAWA Y, OHWATASHI A, HARADA K, YOSHIDA A. The effect of anabolic steroid administration on passive stretching – induced expression of mechano –growth factor in skeletal muscle. **T Scient world J**, 2013; 1-5.

JACKSON K, FRANZ JR, DICHARRY J, EVANS J, KERRIGAN DC. Effect of a supervised hip flexor stretching program on gait in frail elderly patients. **PMR**, 2011;3(4): 330-5.

JÄRVINEN TA, JÓZSA L, KANNUS P, JÄRVINEN TL, JÄRVINEN M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. **J Muscle Res Cell Motil**, 2002; 23(3):245-54.

JARVINEN TA, JARVINEN TL, KAARIANEN M, et al. Muscle injuries: Optimising recovery. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, 2007;21:317–31.



JOHNSON E, BRADLEY B, WITKOWSKI K, MCKEE R, TELESMANIC C, CHAVEZ A, et al. Effect of a static calf muscle-tendon unit stretching program on ankle dorsiflexion range of motion of older women. **J Geriatr Phys Ther**, 2007;30(2):49-52.

JÓZSA L, KANNUS P, THÖRING J, REFFY A, JÄRVINEN M, KVIST M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. **J Bone Joint Surg Br**, 1990, 72(2):293-297.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KADI, F.; KARLSSON, C.; LARSSON, B.; ERIKSSON, J.; LARVA, M.; BILLIG, H.; JONSDOTTIR, I.H. The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscles following ovariectomy. **J Muscle Res Cell Motil**, 2002; 23:335– 339.

KAGAN HM, LI W. Lysil Oxidase: Properties , specificity , and biological roles inside and outside of the cell. **J Cell Bioch**. 2003; 88:660-662

KAMIKAWA Y; IKEDA S; HARADA K; OHWATASHI A; YOSHIDA A. Passive Repetitive stretching for a short duration within a week increases myogenic regulatory factors and myosin heavy chain mRNA in rats' skeletal muscle. **The Scientific World Journal**, 2013; 1-6.

KAN KM, SCOTT A. Mechanotherapy: how physical therapists ' prescription of exercise promotes tissue repair. **Br J Sport Med**, 2009;43:247-251.

KANDARIAN, S.C.; STEVENSON, E.J. Molecular Events in Skeletal Muscle During Disuse Atrophy. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, 2002; 30(3):111-116.

KANDARIAN, S.C.; JACKMAN, R.W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. **Muscle Nerve**, 2006;33(2):155-165.

KARANDIKAR N, VARGAS OO. Kinetic chains: a review of the concept and its clinical applications. **PMR**, 2011; 3(8):739-45.

KRAGSTRUP TW, KJAER M, MACKEY AL. Structural, Biochemical , cellular and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging. **Scand J Med Scienc Sports**, 2011; 21:749-757.

KERRIGAN DC, XENOPOULOS-ODDSSON A, SULLIVAN MJ, LELAS JJ, RILEY PO. Effect of a hip flexor-stretching program on gait in the elderly. **Arch Phys Med Rehabil**, 2003; 84(1):1-6.

KEMP, T. J.; SADUSKY, T. J.; SALTISI, F.; CAREY, N.; MOSS, J.; YANG, S. Y. et al. Identification of Ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrinrepeated protein. **Genomics**, 2000; 66: 229-241.

KETHEYIAN SJ, FOSS ML. **Bases fisiológicas do exercício e do esporte – Fox.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KJAER M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. **Physiol Rev**, 2004;84:649-698.

KJAER, M. ; MAGNUSSON, P. ; KROGSGAARD, M. ; BOYSEN, M. J.; OLESEN, J.; HEINEMEIER, K.; HANSEN, M.; HARALDSSON, B.; KOSKINEN, S.; ESMARCK, B. LANGBERG H. Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. **J Anat**, 2006; 208(4):445-50.

KLEIN D, STONE WJ, PHILLIPS WT, GANGI J, HARTMAM S. PNF training and physical function in assisted-living old adults. **Journal of Aging and Physical Activity**, 2002; 81:1206-1214.

KODAMA, F.Y; CAMARGO, R.C.T; JOB, A. E; OZAKI, G.A.T; KOIKE, T. E; CAMARGO FILHO, J.C.S. Muscle mechanical properties of adult and older rats submitted to exercise after immobilization. **Acta Ortop Bras**, 2012; 21(4): 218-22.

KOJIC, S.; MEDEOT, E.; GUCCIONE, E.; KRMAC, H.; ZARA, I.; MATINELLI, V.; VALLE, G. and FAULKNER, G. The Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. **J. Mol. Biol**, 2004; 339: 313-325.

KONDO W, DAL LAGO EA, FRANCISCO JC, SIMEONI RB, NORONHA L, MARTINS APC, DE AZEVEDO MLV, FERREIRA CC, MAESTRELLI P, OLANDOSKI M, GUARITA-SOUZA LC, DO AMARAL VF. Effect of the bone marrow derived-mononuclear stem cells transplantation in the growth, VEGF-R and TNF-alpha expression of endometrial implants in Wistar rats. **European Journal Obstetric Gynecology Reproduction of Biology**, 2011; 158(2): 298-304.

KONRAD A, TILP M. Increased range of motion after static stretching is not due to changes in muscle tendon structures. **Clin Biomech.** 2014.

KOVANEN V, SUOMINEN H & HEIKKINEN E. Mechanical properties of fast and slow skeletal muscle with special reference to collagen and endurance training. **J Biomech**, 1984; 17: 725–735.

KOSEK DJ, BAMMAN MM. Modulation of the dystrophin-associated protein complex in response to resistance training in young and older men. **J Appl Physiol**, 2008;5:1476–1484.

KOSKINEN SO, WANG W, AHTIKOSKI AM, KJAER M, HAN XY, KOMULAINEN J, KOVANEN V, TAKALA TE. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 2001; 280: R1292–R1300.

KOSKINEN SO., AHTIKOSKI AM., KOMULAINEN J., HESSELINK M.K., DROST MR., TAKALA TE. Short-term effects of forced eccentric contractions on collagen synthesis and degradation in rat skeletal muscle. **Pflugers Arch**, 2002; 444: 59-72.

KOSTEK M.C; CHEN Y-W; CUTHBERTSON D.J; SHI R; FEDELE M.J; ESSER K.A; RENNIE M. J. Gene expression responses over 24 h to lengthening and shortening contractions in human muscle: major changes in CSRP3, MUSTN1, SIX1, and FBXO32. **Physiol Genomics**, 2007; 31: 42–52.

KOKKONEN J, NELSON AG, ELDREDGE C, WINCHESTER JB. Chronic static stretching improves exercise performance. **Med Sci Sports Exerc**, 2007; 39(10):1825-31.

KOKKONEN J, NELSON, AG, CORNWELL A. Acute muscle stretching inhibits maximal strength performance. **Research Quarterly for Exercise and Sport**, 1998; 69(4):411-15.

KRAEMER WJ, RATAMESS N. Fundamentals of Resistance Training: Progression and Exercise Prescription. **Physical Fitness and Performance**, 2004;36(4):674-88.

KREGEL KC, ZHANG HJ. An integrated view oxidative stress in aging: basic mechanism, functional effects, and pathological considerations. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 2007; 292: 18-36.

KUBO K, KANEHISA H & FUKUNAGA T. Effects of resistance and stretching training programmes on the viscoelastic properties of human tendon structures *in vivo*. **J Physiol**, 2002; 538: 219–226.

KUSKO RL, BANERJEE C, LONG KK, DARCY A, OTIS J, SEBASTIANI P, MELOV S, TARNOPOLSKY M, BHASIN S, MONTANO M. Premature expression of muscle fibrosis axis in chronic HIV infection. **Skeletal Muscle**, 2012; 2:1-12.

LAM LC, CHAU RC, WONG BM, FUNG AW, TAM CW, LEUNG GT, et al. A 1-year randomized controlled trial comparing mind body exercise (Tai Chi) with stretching and toning exercise on cognitive function in older Chinese adults at risk of cognitive decline. **J Am Med Dir Assoc**, 2012; 13(6): 15-20.

LANGBERG H, SKOVGAARD D, PETERSEN LJ, BULOW J, KJAER M Type I collagen synthesis and degradation in peritendinous tissue after exercise determined by microdialysis in humans. **J Physiol**, 1999; 521, 299–306

LANGBERG H, ROSENDAL L & KJAER M. Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. **J Physiol**, 2001; 534: 297–302.

LEE SJ.Regulation of muscle mass by myostatin. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 2004; 20:61-86.

LEITE RD, PRESTES J, PEREIRA GB, SHIGUEMOTO GE, PEREZ SEA. Menopause: highlighting the effects of resistance training. **J Sports Med**, 2010; 31: 761 – 767.

LÉGER B, BOCK KD, HESPEL P, RUSSELL AP. Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of akt phosphorylation. **Rejuv. Res**, 2008, 11, 163-175

LIEBER, R.L. & FRIDEN, J. . Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture. **Muscle Nerve**, 2000; 23, 1647–1666.

LI Y, FOSTER W, DEASY BM, CHAN Y, PRISK V, TANG Y, CUMMINS J, HUARD J. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. **Am J Pathol**, 2004; 164:1007-1019.

LI YP, CHEN Y, JOHN J, MOYLAN J, JIN B, MANN DL, REID MB. TNF— $\alpha$  acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. **The FASEB J**, 2005;19:362-370.

LI H.I;ZHANG Q.-C;CHEN J.-W;CHEN S.-Q.;CHEN S.-Y. The fibrotic role of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in injured skeletal muscle after acute contusion. **Phys & Biochem**, 2013; 34:789-794.

LORD SR, MURRAY SM, CHAPMAN K, MUNRO B, TIEDEMANN A. Sit-to-stand performance depends on sensation, speed, balance and psychological status in addition to strength in older people. **J Gerontol**, 2002; 57: M539–43.

LUSTOSA LP, PACHECO MG, LIU AL, GONÇALVES WS, SILVA JP, PEREIRA LS. Impact of static stretching on the gain in knee-extensor strength of community-dwelling older women after a training program. **Rev Bras Fisioter**, 2010;14(6):497-502.

MACEDO ACB, YWAZAKI JL, PACHECO J, GONÇALVES S, GOMES ARS. Efeitos Agudos do alongamento muscular do gastrocnêmio após contusão em ratos. **Fisio Pesq**, 2014; 21 (1): 53-59.

MAEDA T, SAKABE T, SUNAGA A, SAKAI K, RIVERA AL, KEENE DR, SASAID T, STAVNEZER E, IANNOTTI J, SCHWEITZER R, ILLIC D, BASKARAN H, SAKAI T. Conversion of mechanical force into TGF- $\beta$ - mediated biochemical signals. **Curr Biol**, 2011 ; 21 : 933-941.

MACKEY AL, DONNELLY AE, TURPEENNIEMI-HUJANEN T, ROPER HP. Skeletal muscle collagen content in humans after high-force eccentric contractions. **J Appl Physiol**, 2004 ; 97 : 197-203.

MACKEY AL, DONNELLY AE, ROPER HP. Muscle connective tissue content of endurance –trained and inactive individuals. **Scand J Med Sci Sport**, 2005; 15 :402-408.

MACKENZIE MG, HAMILTON DL, PEPIN M, PATTON A, BAAR K. Inhibition of Myostatin signaling through notch activation following acute resistance exercise. **PLOS one**, 2013; 8(7) :1-7

MALTAIS ML, DESROCHES J, DIONNE IJ. Changes in muscle mass and strength after menopause. **J Musc Neur Interact**, 2009; 9 : 186 – 197.

MARANGONI AH. Effects of intermittent stretching exercises at work on musculoskeletal pain associated with the use of a personal computer and the influence of media on outcomes. **Work**, 2010;36(1):27-37.

MARTINS WR, OLIVEIRA RJ, CARVALHO RS, DAMASCENO VO, SILVA VZM, SILVA MS. Elastic resistance training to increase muscle strength in elderly: A systematic review with meta-analysis. **Arch of Geront and Geriat**, 2013; 57: 8-15.

MARZETTI E, PRIVITERA G, SIMILI V, WOHLGEMUTH SE, AULISA L, PAHOR M, LEEUWENBURGH C. Multiple pathway to the same end: mechanism of myonuclear apoptosis in sarcopenia aging. **T Scient W J**, 2010; 10:340-349.

MAGNUSSON SP, SIMONSEN EB, DYHRE-POULSEN P, AAGAARD P, MOHR T & KJAER M. Viscoelastic stress relaxation during static stretch in human skeletal muscle in the absence of EMG activity. **Scand J Med Sci Sports**, 1996; 6: 323-8.

MANN CJ, PERDIGUERO E, KHARRAZ Y, AGUILAR S, PESSINA P, SERRANO AL, MUNOS-CÁVONES P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skeletal Muscle**, 2011; 1:21.

MATTIELO-SVERZUT AC; PETERSEN SG; KJAER M, MACKEY AL. Morphological adaptation of muscle collagen and receptor of advanced glycation end product (RAGE) in osteoarthritis patients with 12 weeks of resistance training: influence of anti-inflammatory or glucosamine treatment. **Rheumatol Int**, 2013; 33: 2215-2224

McCORMICK R. The flexibility of the collagen compartment muscle. **Meat Science**. 1994; 79-91.

MCLENNAN IS: Localisation of transforming growth factor beta 1 in developing muscles: implications for connective tissue and fiber type pattern formation. **Dev Dyn**, 1993; 197:281-290.

MCCLUNG JM, DAVIS JM, WILSON MA, GOLDSMITH EC, CARSON JA. Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. **J Appl Physiol**, 2006; 100(6):2012-23.

MENG SJ, YU LJ. Oxidative Stress, Molecular Inflammation and Sarcopenia: review. **International Journal of Molecular Science**, 2010;11:1509-1521.

MILLER BF, OLESEN JL, HANSEN M, DOSSING S, CRAMERI RM, WELLING RJ, LANGBERG H, FLYVBJERG A, KJAER M, BABRAJ JA, SMITH K, RENNIE MJ. Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. **J Physiol**, 2005;567: 1021–1033.

MILLER TA, LESNIEWSKI LA, MULLER\_DELP J, MAJORS AK, SCALISE D, DELP MD. Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, 2001; 281: R1710–R1717.

MISZKO TA, CRESS ME, SLADE JM, COVEY CJ, AGRAWAL SK, DOERR CE. Effect of strength and power training on physical function in community-dwelling older adults. **J Gerontol A Biol Med Sci**, 2003; 58 (2):171-175.

MOORE DR, PHILLIPS SM, BABRAJ JA, SMITH K, RENNIE MJ .Myofibrillar and collagen protein synthesis in human skeletal muscle in young men after maximal shortening and lengthening contractions.**Am J Physiol Endocrinol Metab** 2005; 288: E1153–E1159.

MORAN AL, WARREN GL, LOWE DA. Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. **J Appl Physiol**, 2006;100(2):548-59.

MORGAN, D. L., LYNN, R. Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers than does incline running. **J. Appl. Physiol**, 1994; 77: 1439-1444.

MOREIRA MA, BRITO, MV, BRITO NM, FILHO, MS. Estudo histomorfométrico do músculo esquelético de ratos em anestro. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 2005; 20: 329-355.

MORSE CI, THOM JM, BIRCH KM, et al. Changes in triceps surae muscle architecture with sarcopenia. **Acta Physiol Scand**, 2005; 183: 291-8,

MOSELEY AM, SHERRINGTON C, ELKINS MR, HERBERT RD, MAHER CG. Indexing of randomised controlled trials of physiotherapy interventions: a comparison of AMED, CENTRAL, CINAHL, EMBASE, hooked on evidence, PEDro, PsycINFO and PubMed. **Physiotherapy**, 2009;95(3):151-156.

MU X, LI Y. Conditional TGF $\beta$ -1 treatment increases stem cell –like cell population in myoblasts. **J Cell Mol Med**, 2011; 15(3): 679-690.

NARICI MV, MAGANARIS CN, REEVES ND, CAPODAGLIO. Effect of aging on human architecture. **J Appl Physiol**, 2003; 95 (6): 2229- 2234.

NARICI MV, MAGANARIS CN. Adaptability of elderly human muscles and tendons to increased loading. **J Anat.**, 2006; 208:433-443.

NARICI MV, MAGANARIS CN. Plasticity of the muscle-tendon complex with disuse and aging. **Exerc Sport Sci Rev**, 2007; 35(3):126-34.

NARICI MV, MAFFULLI N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. **Br Med Bull**, 2010; 95: 139–159

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, DC. National Academy Press, 1996.

NAGASE H., WOESSNER J.F.Jr. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, 1999; 274: 21491-21494.

NELSON AG, KOKKONEN J, ARNALL AD. Acute muscle stretching inhibits muscle strength endurance performance. **Journal of Strength and Conditioning Research**, 2005;19(2):338-43.

NISTIAR F;RACZ O; LUKACINOVA A; HUBKIVA B; NOVAKOVA E; SEDLAKOVA E. Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment. **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering** 2012; 47:1224-1233.

NILWIK, R; SNIJDERS, T; LEENDERS, M; GROEN, R.B.L; KRANENBURG, J.A. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. **Experimental Gerontology**, 2013; 48: 492– 498,

NONAKA H, MITA K, WATAKABE M, AKATAKI K, SUZUKI N, OKUWA T, et al. Age-related changes in the interactive mobility of the hip and knee joints: a geometrical analysis. **Gait Posture**, 2002; 15(3):236-43.

OCHALA J, LAMBERTZ D, POUSSON M, GOUBEL F, VAN HOECHE J. Changes in mechanical properties of human plantar flexor muscles in aging. **Experimental Gerontology**, 2003; 39:349-358.

OLESEN JL, HEINEMEIER KM, GEMMER C, KJAER M, FLYVBJERG A & LANGBERG H. Exercise dependent IGF-I, IGFBPs and type-I collagen changes in human peritendinous connective tissue determined by microdialysis. **J Appl Physiol**, 2006; 102: 214–220.

OWINO, V; YANG, S.Y.; GOLDSPINK,G. Age-related loss of skeletal muscle function and the inability to express the autocrine form of insulin-like growth factor-1 (MGF) in response to mechanical overload. **FEBS Letters** 2001; 505: 259-263.

PAGE P. Current concepts in muscle stretching for exercise and rehabilitation. **Int J Sports Phys Ther**, 2012; 7:109-19.

PEAKE J, DELLA GATTA P, CAMERON-SMITH D. Aging and its effects on inflammation in skeletal muscle at rest and following exercise-induced muscle injury. **Am J Physiol Reg Int Comp Physiol**, 2010; 298(6):R1485–R1495

PEIXINHO CC,MARTINS NSF, OLIVEIRA LF, MACHADO JC. Reliability of Measurements of Lateral Gastrocnemius Architectural Parameters obtained from Ultrasound Biomicroscopic Images. **PLOS ONE**, 2014; 9(2): 1-6.

PEIXOTO SV, GIATTI L, AFRADIQUE ME, LIMA-COSTA MF. Custo das internações hospitalares entre idosos brasileiros no âmbito do Sistema Único de Saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 2004; 13(4): 239 – 246.

PEHME A, ALEV K, KAASIK P, SEENE T. Age-related changes in skeletal-muscle myosin heavy-chain composition: effect of mechanical loading. **J Aging Phys Act**, 2004;1:29–44.

PEVIANI SM, GOMES AR, MOREIRA RF, MORISCOT AS, SALVINI, T.F. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve**, 2007; 35: 363-370.

PEVIANI SM, GOMES AR, SELISTRE DE ARAUJO HS, SALVINI TF. MMP-2 is not altered by stretching in skeletal muscle. **Int J Sports Med**, 2009; 30(7): 550-554.

PEVIANI SM, RUSSO TL, DURIGAN JL, VIEIRA BS, PINHEIRO CM, GALASSI MS, et al. Stretching and electrical stimulation regulate the metalloproteinase-2 in rat denervated skeletal muscle. **Neurol Res**, 2010;32:891-6.

PHILLIPS T, LEEUWENBURGH C. Muscle fiber specific apoptosis and TNF- $\alpha$  signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. **FASEB J**, 2005; 19, 668-670.

PRESTES J, FERREIRA CKO, DIAS R, FROLLINI AB, DONATTO FF, CURY-BOAVENTURA MF, GUERESCHI MG, PITHON-CURI TC, VERLENGIA R, PALANCH AC, CURI C, CAVAGLIERI CR. Lymphocyte and cytokines after short periods of exercise. **Int J Sports Med**, 2008; 29:1010-1014

PIJNAPPELS M, BURG JCE, REEVES ND, DIEEN JH. Identification of elderly fallers by muscle strenght measures. **Eur J Appl Physiol**, 2008; 102 (5): 585-592.

PLENTZ RD, SBRUZZI G, RIBEIRO RA, FERREIRA JB, DAL LAGO P. Inspiratory muscle training in patients with heart failure: meta-analysis of randomized trials. **Arq Bras Cardiol**, 2012;99(2):762-71.

POLIZELLO JC, CARVALHO LC, FREITAS FC, PADULA N, MARTINEZ EZ & MATTIELLO-SVERZUT AC. Morphological effects of resumption of loading after immobilization of skeletal muscles in lengthened position in female rats. **Rev Bras Fisioter**, 2011; 15, 73-9.

POMPERMAYER MG, GONÇALVES AK . Relação Entre Capacidades Motoras De Idosas Praticantes De Hidroginástica E Alongamento. **Estud. interdiscipl. envelhec.**, 2011;16: 473-484.

RADFORD JA, BURNS J, BUCHBINDER R, LANDORF KB, COOK C. Does stretching increase ankle dorsiflexion range of motion? A systematic review. **Br J Sports Med**, 2006; 40:870-875.

RAMASWAMY KS, PALMER ML, MEULEN JH, RENOUX A, KOSTROMINOVA TY, MICHELE DE, FAULKNER JA. Lateral transmission force in impaired in skeletal muscles of dystrophic mice and very old rats. **J Physiol**. 2011; 1195-1208.

RAMIREZ, C; RUSSO,T.L; DELFINO, G; PEVIANI, S.M; ALCANTARA, C; SALVINI, T.F. Effect of tibiotarsal joint inflammation on gene expression and cross-sectional area in rat soleus muscle. **Braz J Phys Ther**, 2013; 17(3):244-254.

RYALL JG, SCHERTZER JD, LYNCH GS: Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. **Biogerontology**, 2008; 9:213-228.



RECHERT-FARIA A.,JUNG JE.,MORESCHI NETO V.,SILVA DE CASTRO CC.,MIRA MT, NORONHA L. Reduced immunohistochemical expression of Discoidin Domain Receptor 1(DDR1) in vitiligo skin. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, 2012; 1-2.

RENNO, AM.; GOMES, A.R.S.; NASCIMENTO, R.B.; SALVINI, T.; PARIZOTO, N. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. **Exp Gerontol**, 2007; 42(6):517-22.

RICE KM, PRESTON DL, NEFF D, NORTON M, BLOUGH ER. Age-related dystrophin-glycoprotein complex structure and function in the rat extensor digitorum longus and soleus muscle. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 2006;11:1119–1129.

ROBINSON K, DICKERSIN K. Development of a highly sensitive search strategy for the retrieval of reports of controlled trials using PubMed. **Int J Epidemiol**, 2002;1(31):150-153.

ROCHA NP, REIS HJ, TEIXEIRA AL. *Inflammaging*: um novo paradigma para as ciências gerontológicas. **Geriatrics & Gerontologia**. 2010; 4 (4): 224-228.

RODAKI AL, SOUZA RM, UGRINOWITSCH C, CRISTOPOLISKI F, FOWLER NE. Transient effects of stretching exercises on gait parameters of elderly women. **Man Ther**, 2009; 14(2):167-72.

RUSSEL B, MOTLAGH D, ASHLEY WM. Form follows function: how muscle shape is regulated by work. **J Appl Physiol**. 2000; 88: 1127-1132.

RUSSO TL, PEVIANI SM, DURIGAN JL, GIGO-BENATO D, DELFINO GB, SALVINI TF. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogen-1 in denervated rat skeletal muscle. **J Muscle Res Cell Motil**, 2010;31(1):45-57.

RYALL, J.G.; SCHERTZER, J.D.; LYNCH, G.S. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. **Biogerontol**, 2008; 9:213-228.

RYAN ED, BECK TW, HERDA T J, HULL HR, HARTMAN MJ, COSTA P B. et al. The time course of musculotendinous stiffness responses following different durations of passive stretching. **J Orthop Sports Phys Ther**, 2008;38(10):632-9.

SABOURIN, L. A. & RUDNICKI, M. A. The molecular regulation of myogenesis. **Clin. Genet**, 2000; 57: 16-25,.

SCWARTZ, M. A.; SCHALLER, M. D. and GINSBERG, M. H. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol**, 1995; 11: 549-599.

SALMON AB, RICHARDSON A, PÉREZ VI. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play role in aging or healthy aging? **.Free Radical Biol Med**, 2010; 48:642-655.

SALONEN V, LEHTO M, KALIMO M, PENTTINEN R, ARO H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. **Musc Nerv**, 1985; 8(2):125-131.

SALVINI TF, DURIGAN JLQ, PEVIANI SM, RUSSO TL. Effects of electrical stimulation and stretching on the adaptation of denervated skeletal muscle - implications for physical therapy. **Rev. Bras. Fisiot**, 2012; 16(3) :175-83.

SAKAMOTO, K., ASCHENBACH, W.G., HIRSHMAN, M. F. GOODYEAR, L.J. Akt signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2003; 285: E1081–E1088,.

SAMUEL D & ROWE PJ . Effect of ageing on isometric strength through joint range at knee and hip joints in three age groups of older adults. **Gerontology**, 2009; 55, 621-9.

SANTOS JLF, LEBRÃO ML, DUARTE YAO, LIMA FD. Functional performance of the elderly in instrumental activities of daily living: an analysis in the municipality of São Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, 2008; 24(4):879-886.

SCHILD C, TRUEB B. Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor. **Exp Cell Res**. 2002; 274: 83–91.

SCWARTZ, M. A.; SCHALLER, M. D. and GINSBERG, M. H. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.** 1995; 11: 549-599.

SECCHI KV, MORAIS CP, CIMATTI PF, TOKARS E, GOMES ARS. Efeito do alongamento e do exercício contra-resistido no músculo esquelético de rato. **Rev. bras. fisioter**, 2008; 12 (3):228-34.

SEENE, T.; KAASIK, P.; MARIA-RISO, E. Review on aging, unloading and reloading: Changes in skeletal muscle quantity and quality. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, 2012; 54: 374–380.

SHIER, I. Does stretching improve performance? A systematic and critical review of the literature. **Clin J Sport Med**, 2004; 14:267-273.

SMITH, C.A.; STAUBER, F.; WATERS, C.; ALWAYS, S.; STAUBER, W. Transforming growth factor-  $\beta$  following skeletal muscle strain injury in rats. **J Appl Physiol**, 2007; 102: 755–761.

SYEDNAIN, A.H; TRANQUILLO. R.T. TGF- $\beta$ 1 diminishes collagen production during long-term cyclic stretching of engineered connective tissue: Implication of decreased ERK signaling. **J Biomech**, 2011; 44(5): 848–855.

SIU PM, PISTILLI EE. Alway, S.E. Age-dependent increase in oxidative stress in gastrocnemius muscle with unloading. **J. Appl. Physiol**, 2008; 105: 1695-705.

SHIER. Does Stretching Improve Performance? A Systematic and Critical Review of the Literature. **Clin J Sport Med**, 2004; 14(5).

SMALL K, MC NAUGHTON L & MATTHEWS M. A systematic review into the efficacy of static stretching as part of a warm-up for the prevention of exercise-related injury. **Res Sports Med**, 2008; 16: 213-31.

SOUICIE JM, WANG C, FORSYTH A, FUNK S, DENNY M, ROACH KE, et al. Range of motion measurements: reference values and a database for comparison studies. **Haemophilia**, 2011; 17(3):500-7.

STAUBER WT, WILLEMS MET. Prevention of histopathologic changes from 30 repeated stretches of active rat skeletal muscle by long inter-stretch rest times. **Eur. J. Appl. Physiol**, 2002; 88, 94-99.

STAMENKOVIC I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol**, 2000; 10: 415-433.

SHAH, S.; DAVIS, J.; WEISLEDER, N.; KOSTAVASSILI, I.; MCCULLOCH, A. D.; RALSTON, E.; CAPETANAKI, Y. and LIEBER, R. Structural and Functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation. **Biophys. J**, 2004; 86: 2993-3008,.

SHWARTZ Y, BLITZ E, ZELZER E. One load to rule them all: Mechanical control of the musculoskeletal system in development and aging. **Different**, 2013; 86:104-111.

STANZIANO DC, ROOS BA, PERRY AC, LAI S, SIGNORILE JF. The effects of an active-assisted stretching program on functional performance in elderly persons: a pilot study. **Clin Interv Aging**, 2009; 4:115-20.

STREET, S. F. Lateral transmission of tension in frog myofibers: a myofibrillar network and transverse cytoskeletal connections are possible transmitters. **J. Cell Physiol**. 1983; 114: 346-364.

STONE MH. Implications for connective tissue and bone alterations resulting from resistance exercise training. **Med Sci Sports Exerc**, 1988; 20(5 Suppl):S162-8.

STUDENSKI S, PERERA S, PATEL K, ROSANO C, FAULKNER K, INZITARI M, et al. Gait speed and survival in older adults. **JAMA**, 2011; 305(1):50-8.

SUETTA C, FRANDSEN U, MACKEY AL, JENSEN L, HVID LG, BAYER ML, PETERSSON SJ, SCHODER HD, ANDERSEN JL, AAGAARD P, SCHJERLING P, KJAER M. Ageing is associated with diminished muscle re-growth and myogenic precursor cell expansion early after immobility-induced atrophy in human skeletal muscle. **J Physiol**, 2013; 591: 3789-3804.

SWANK AM, FUNK DC, DURHAM MP, ROBERTS S. Adding weights to stretching exercise increases passive range of motion for healthy elderly. **J Strength Cond Res**, 2003; 17(2):374-8.

TABARY, J. C.; TABARY, C.; TARDIEU, C.; TARDIEU, G.; GOLDSPINK, G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. **The Journal of Physiology**, 1972; 224(1):231-44.

TAKALA TE, VIRTANEN P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. **Scand J Med Sci Sports**, 2000; 10(6):321-325.

TAYLOR, D.C; DALTON, J. D; SEABER, A. V; GARRETT W.E. Viscoelastic properties of muscle-tendon units. The biomechanical effects of stretching. **Am J Sports Med**, 1990; 18: 300-9.

TAYLOR DC, BROOKS DE, RYAN JB. Viscoelastica characteristics of muscle: passive stretching versus muscular contractions. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 1997; 1619-1624.

TIIDUS, P.M.; HOLDEN, D.; BONBARDIER, E.; ZAJCHOWSKI, S.; ENNS, D.;BELCASTRO, A. Estrogen effect on post exercise skeletal muscle neutrophil infiltration and cal pain activity. **Can J Physiol Pharmacol**, 2001; 79(5):400-6.

TOIGO, M; BOUTELLIER, U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. **Eur J Appl Physiol**, 2006; 97: 643–663.

THOMAS DR. Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. **Clin Nutr.**, 2007; 26(4):389-99.

TRAPPE T. Influence of aging and long-term unloading on the structure and function of human skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab**, 2009: 34: 459–464.

VAN, DER HEIDE, L.P.; HOEKMAN, M.F. & SMIDT, M.P. The ins and outs of FOXO shuttling: mechanisms of FOXO translocation and transcriptional regulation. **J Biochem**, 2004; 380:297-309.

VERDIJK, L.B.; KOOPMAN, R.; SCHAART, G.; MEIJER, K.; SAVELBERG, H.H.C.M.; VAN LOON, L.J.C. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, 2007; 292: E151-E157.

VISSE R & NAGASEH. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, 2003; 92: 827–839.

VISSER M, SCHAAP LA. Consequences of sarcopenia. **Clin Geriatr Med.**, 2011;27(3):387-399.

VISSER M, KRITCHEVSKY SB, GOODPASTER BH, NEWMAN AB, NEVITT M, STAMM E, et al. Leg muscle mass and composition in relation to lower extremity performance in men and women aged 70 to 79: the health, aging and body composition study. **J Am Geriatr Soc**, 2002; 50(5):897-904.

VAREJÃO RV, DANTAS EHM, MATSUDO SMM. Comparação dos efeitos do alongamento e do flexionamento, ambos passivos, sobre os níveis de flexibilidade, capacidade funcional e qualidade de vida do idoso. **R. bras. Ci e Mov**, 2007;15(2):87-95.

WATT JR, JACKSON K, FRANZ JR, DICHARRY J, EVANS J, KERRIGAN DC. Effect of a supervised hip flexor stretching program on gait in elderly individuals. **PMR**, 2011;3(4): 324-9.

WATT JR, JACKSON K, FRANZ JR, DICHARRY J, EVANS J, KERRIGAN DC. Effect of a supervised hip flexor stretching program on gait in frailty elderly individuals. **PMR**, 2011;3(4): 324-9.

WAKAI S, ISHOKAWA Y, NAGAOKA M, OKABE M, MINAMI R, HAYAKAWA T. Central nervous system involvement and generalized muscular atrophy in occipital horn syndrome: Ehlers-Danlos type IX. A first Japanese Case. **J Neurol Sci**, 1993; 116:1-5.

WEPLER, C.H.; MAGNUSSON, S.P. Increasing muscle extensibility: a matter of increasing length or modifying sensation. **Phys Ther**, 2010; 90(3):438-449.

WILLIAMS MET, MILLER GR, STAUBER WT. Force deficits after stretches of activated rat muscle-tendon complex with reduced collagen cross-linking. **European J Appl Physiol**, 2001; 85: 405-411.

WILLIAMS, P. E. Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 1990;49(5):316-17.

WILLIAMS PE, GOLDSPINK G. Longitudinal growth of striated muscle fibres. **J. Cell Sci**, 1971; 9: 751-761.

WILLIAMS PE, GOLDSPINK G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. **Journal of Anatomy**, 1978; 127: 459-468.

WILLIAMS PE. Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. **Ann. Rheum. Dis**, 1988; 47:1014-1016.

WILLIAMS, P.E; GOLDSPINK, G. Connective tissue changes in immobilized muscle. **J. Anat.**, 1984; 138: 343-50.

WILLIAMS PE, CATANESE T, LUCEY EG & GOLDSPINK G. The importance of stretch and contractile activity in the prevention of connective tissue accumulation in muscle. **J Anat** ,1988;158: 109-14.

WIPFF, PJ; RIFKIN, D.B; MEISTER, J.J; HINZ, B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- $\beta$ 1 from the extracellular matrix. **The Journal of Cell Biology**, 2007; 179(6):1311–1323

WHO. World Health Organization. Geneva: World health statistics. 2011.

WYNN TA. Cellular and Molecular mechanisms of fibrosis. **Journal of Pathology**, 2008;214:199-210.

WU M, FANNIN J, RICE KM, WANG B, BLOUGH ER. Effect of aging on cellular mechanotransduction. **Ageing Res Rev.** 2011; 10 (1):1-15.

YAMAZAKI M, MINOTA S, SAKURAI H, YAMADA A, KANAZAMA I, KAWAI M. Expression of transforming growth-factor-  $\beta$ 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. **Am J Pathol**, 1994; 144:221-226.

YANG, H.; ALNAQEEB, M.; SIMPSON, H.; GOLDSPIK, G. Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. **J Anat**, 1997; 190 (4): 613-622.

ZAKAS A, DOGANIS G, ZAKAS N, VERGOU A. Acute effects of active warm-up and stretching on the flexibility of elderly women. **J Sports Med Phys Fitness**, 2006;46(4):617-22.

ZAR JH..**Biostatistical Analysis**. 4 ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1998.

ZOTZ TGG, LOUREIRO APC, VALDERRAMAS SR, GOMES ARS. Stretching - an important strategy to prevent musculoskeletal aging: a systematic review and meta-analysis. *Topics in Geriatric Rehabilitation*, 2014 DOI: 10.1097/TGR.0000000000000032 *in press*

ZHONG S, CHEN CN, THOMPSON LV. Sarcopenia of ageing: functional, structural and biochemical alterations. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, 2007; 11:91-97.

## **ANEXOS**

## ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Uso Animal



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética  
Comitê de Ética no Uso de Animais

PUCPR

Curitiba, 20 de setembro de 2012.

**PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA****REGISTRO DO PROJETO:** 732 – 1ª versão**TÍTULO DO PROJETO:** Efeito do alongamento no músculo esquelético de ratas: Avaliação morfológica e molecular**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Talita Gianello Gnoato Zotz**EQUIPE DE PESQUISA:**

Talita Gianello Gnoato Zotz, Anna Raquel Silveira Gomes, Sabrina Peviani Messa, Ana Paula Cunha Loureiro, Rafael Zotz, Eduard Goossen, Luiz Guilherme Achcar Capriglione, Luis Cláudio Fernandes, Lucia Noronha, Paulo Roberto Slud Brofman, Edvaldo Trindade, Emanuel Souza, Mario Navarro, Tania Salvini

**INSTITUIÇÃO:**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**ESCOLA / CURSO:**

Escola de Saúde e Biociências / Fisioterapia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Ratos Wistar</i>	Fêmea	3 meses / 230g	B	10
<i>Ratos Wistar</i>	Fêmea	24 meses / 350g	B	20

O colegiado do CEUA em reunião no dia 20/09/2012, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o





## Anexo II - PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO

### **APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS:**

- 1- ZOTZ TGG, MESSA SP, GOOSEN E, ZOTZ R, GOMES ARS. Mensuração da força necessária para alongar o músculo sóleo de ratas idosas, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho).8º Congresso Sul-Brasileiro de Geriatria e Gerontologia.
- 2 - ZOTZ TGG, PEVIANI SM, SALVINI T, MARTINS HFR, GOMES ARS. Efeito Agudo do Alongamento na área de secção transversa do músculo sóleo de ratas idosas. 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho). XXIV Jornada Paranaense de Geriatria e Gerontologia.
- 3 - ZOTZ TGG, MESSA SP, GOOSEN E, ZOTZ R, GOMES ARS. Aged-related differences in the force to stretch soleus muscle of female rats. 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho). 61st Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, World Congress on Exercise is Medicine and World Congress on the Role Inflammation in Exercise, Health and Disease.

### **PREMIAÇÃO DE TRABALHO EM REUNIÃO CIENTÍFICA**

**Premiação 2º Lugar Poster.** ZOTZ TGG, PEVIANI SM, SALVINI T, MARTINS HFR, GOMES ARS. Efeito Agudo do Alongamento na área de secção transversa do músculo sóleo de ratas idosas. 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho). XXIV Jornada Paranaense de Geriatria e Gerontologia.

### **RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS**

- 1- ZOTZ TGG, MESSA SP, GOOSSEN E, ZOTZ R, GOMES ARS. Mensuração da força necessária para alongar o músculo sóleo de ratas idosas, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho).8º Congresso Sul-Brasileiro de Geriatria e Gerontologia.
- 2- ZOTZ TGG, PEVIANI SM, SALVINI T, MARTINS HFR, GOMES ARS. Efeito Agudo do Alongamento na área de secção transversa do músculo sóleo de ratas idosas. 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho). XXIV Jornada Paranaense de Geriatria e Gerontologia.

- 3- ZOTZ TGG, MESSA SP, GOOSEN E, ZOTZ R, GOMES ARS. Aged-related differences in the force to stretch soleus muscle of female rats. 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho). 61st Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, World Congress on Exercise is Medicine and World Congress on the Role Inflammation in Exercise, Health and Disease.

### **MANUSCRITO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**

- 1 - Talita Gianello Gnoato Zotz; Ana Paula Cunha Loureiro; Silvia Regina Valderramas; Anna Raquel Silveira Gomes. Stretching—An Important Strategy to Prevent Musculoskeletal Aging: A Systematic Review and Meta-analysis. *Topics in Geriatric Rehabilitation*. 2014.

### **MANUSCRITOS SUBMETIDOS:**

- 1 - Talita Gianello Gnoato Zotz; Rafael Zotz; Eduard Goosen; Anna Raquel Silveira Gomes. Mechanical Device to Stretch Rat Skeletal Muscle. *Medical & Biological Engineering & Computing*.
- 2 - Talita Gianello Gnoato Zotz; Hilana Rickli Fiuza Martins; Anna Raquel Silveira Gomes. Acute Effects of Muscle Stretching Exercise on the Soleus Muscle of female aged rats. *Age*.